



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE REDES POLIMÉRICAS
SEMI-INTERPENETRADAS BASADAS EN
POLI(DIMETILSILOXANO)/QUITOSANO/POLI(ALCOHOL
VINÍLICO) ENTRECruzADAS CON GENIPIN PARA EMULAR EL
COMPORTAMIENTO MECÁNICO DE LA PIEL HUMANA**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

M.en C. JORGE ALEJANDRO BENÍTEZ MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL

**DR. FRANCISCO MANUEL SÁNCHEZ ARÉVALO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**DR. AGILEO HERNÁNDEZ GORDILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Noviembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*The horse is prepared against the
day of battle, but the victory belongs
to the LORD*

Proverbs 21:31

Dedico esta tesis a los pilares fundamentales de mi vida, aquellos cuyas influencias y apoyo inquebrantable han sido esenciales en mi camino académico y personal. A los mejores padres, Jorge Benítez y Adriana Martínez, los agradezco infinitamente por su amor incondicional, sus sacrificios, y por inculcarme valores que han guiado mi vida. A mis adorados hermanos, Sofía Benítez y Mauricio Benítez, agradezco las aventuras compartidas, los consejos sinceros y el apoyo constante a lo largo de los años. A mi amada esposa, Samantha Álvarez, le dedico un lugar especial en estas palabras. Tu amor, paciencia y comprensión me han sostenido en los momentos de mayor presión y frustración. Tu aliento constante me ha impulsado a superar obstáculos, alcanzar mis metas y a no darme por vencido. Eres mi compañera de vida y mi fuente de inspiración constante.

Esta tesis es el resultado de no solo mi esfuerzo, sino también del apoyo inquebrantable de cada uno de ustedes. Son mi razón de ser y los agradezco desde lo más profundo de mi corazón. Sus valores, apoyo y amor han sido el faro que me ha guiado a lo largo de esta aventura académica. Estoy eternamente agradecido por tenerlos en mi vida y por ser una parte integral de mi éxito.

Los amo

Agradecimientos

En estas líneas, me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a las instituciones y personas que hicieron posible la culminación de esta investigación. En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionarme una educación de excelencia y calidad, así como por su amplio acervo bibliográfico, que fue un recurso invaluable para mi investigación. Asimismo, agradezco al Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) por brindarme la oportunidad de continuar mi formación profesional. Especialmente, quiero expresar mi gratitud al Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo, mi tutor, por su valioso apoyo y orientación continua. Igualmente, agradezco al Dr. Agileo Hernández Gordillo, miembro de mi comité tutor, por su tiempo, y apoyo invaluable durante el desarrollo del proyecto. Así como también, a los Doctores Enrique Geffroy Aguilar, Marco Antonio Reyes Huesca, y Jairo Eduardo Leiva Mateus por su colaboración y asesoramiento en las pruebas reológicas de los materiales desarrollados. Mi gratitud se extiende a los técnicos académicos del IIM que contribuyeron en la caracterización físico-química de los materiales desarrollados en este trabajo, en especial a la M. en C. Adriana Tejeda Cruz, al Ing. Carlos Flores Morales, al Químico Miguel Ángel Canseco Martínez y a la Q.F.B. Karla Eriseth Reyes

Morales. Adicionalmente, agradezco a la Mtra. Ma. Teresa Vázquez Mejía y a la Lic. Oralia Leticia Jiménez Álvarez por su apoyo en los servicios bibliotecarios. Así como también a Alan Ortega, al Mtro. Omar Alejandro Pompa García y a Cain González Sánchez por su apoyo en los servicios de cómputo.

Agradezco el apoyo financiero al CONACyT y al PAEP por las becas otorgadas durante mis estudios de doctorado y a los proyectos PAPIIT UNAM DGAPA IN102421 e IN101624 por el apoyo financiero para la ejecución de este proyecto de investigación. De igual manera, deseo expresar mi agradecimiento al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia, en particular al Dr. Genaro Vázquez Victorio, miembro de mi comité tutor, al Dr. Mathieu Hautefeuille, a la M. en C. Adriana Rodríguez Hernández y al Dr. Daniel Pérez Calixto por su disposición y asesoramiento en la caracterización biológica y las pruebas de micro-indentación de los materiales desarrollados. No puedo dejar de mencionar a mis compañeros de laboratorio, Gabriel, Armando, Cecilia, Marisol y Nadia, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando lo necesitaba. Por último, agradezco sinceramente a mis sinodales, el Dr. Fernando Velázquez Villegas, el Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez, la Dra. Nadia Adriana Vázquez Torres y la Dra. Itzel Marisol Garnica Palafox, por su valiosa revisión y contribuciones a este trabajo, que fueron esenciales en la culminación de esta tesis de doctorado.

Resumen

En el presente proyecto doctoral se presentan contribuciones importantes en dos diferentes áreas. La primera en la ciencia e ingeniería de materiales, la cual consistió en lograr la obtención de tres redes poliméricas semi interpenetradas (RPSIs) basadas en dos polímeros sintéticos -poli(dimetilsiloxano), poli(alcohol vinílico)- y uno natural -quitosano-. En esta línea, se logró tener un mejor entendimiento de la interacción entre los componentes de la mezcla polimérica y sus propiedades físico-químicas, tales como: estabilidad mecánica, rugosidad, hidroflicidad de superficie (ángulo de contacto), hidroflicidad de volumen (hinchamiento) y estabilidad térmica. La segunda contribución está orientada al área médica, específicamente como una propuesta de material capaz de promover el crecimiento de células.

En este sentido, se han concluido los primeros estudios de evaluación e interacción de las RPSIs en un entorno biológico *in vitro* en función de las proporciones de los componentes, a través de las pruebas de viabilidad celular y citotoxicidad. Los resultados obtenidos en estas pruebas muestran ser prometedores hasta este momento para su posible aplicación como cubierta dérmica que propicie la cicatrización. Así, se espera que en un futuro las

RPSIs cumplan todos los requisitos para dicha aplicación y que, en algún momento, puedan estar disponibles en el sistema de salud mexicano a un costo asequible.

Asimismo, los materiales desarrollados en esta investigación han dado pauta para otra línea de investigación, la cual consiste en la elaboración de esponjas poliméricas destinada a la captura de colorantes orgánicos, como el azul ácido 113 [1].

Índice general

Agradecimientos	v
Resumen	vii
Introducción	xxi
1. Antecedentes	1
1.1. Hidrogeles	10
1.2. Modelos artificiales de piel	14
1.3. Hipótesis y Objetivos	16
1.3.1. Hipótesis	16
1.3.2. Objetivos	17
2. Metodología y técnicas experimentales	19
2.1. Materiales	20
2.2. Preparación de las redes poliméricas	
semi-interpenetradas (RPSIs)	20
2.2.1. Mezcla CS/PVA/GEN	21
2.2.2. Preparación de la disolución PDMS/CS/PVA/GEN	22

2.2.3.	Determinación de punto de gelificación de las RPSIs.	23
2.2.4.	Síntesis de las RPSIs en forma de membranas	23
2.3.	Caracterización fisicoquímica	26
2.3.1.	Topografía de la superficie de las membranas	26
2.3.2.	Hidrofilicidad de superficie y volumen	28
2.3.3.	Interacción química de las RPSIs utilizando la espectroscopía FT-IR	29
2.3.4.	Estabilidad térmica, cristalinidad de las RPSIs	31
2.4.	Comportamiento mecánico de las RPSIs	32
2.4.1.	Tracción Uniaxial	32
2.4.2.	Tracción Biaxial	36
2.4.3.	Microindentación	37
2.5.	Caracterización biológica	39
2.5.1.	Cultivo celular	40
2.5.2.	Preparación de las muestras para ensayos <i>in vitro</i> de viabilidad celular y citotoxicidad	40
2.5.3.	Formación de constructos	41
2.5.4.	Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad <i>in vitro</i>	42
2.5.5.	Conteo celular y análisis morfológico	43
3.	Resultados	45
3.1.	Topografía de la superficie de las RPSIs	49
3.2.	Hidrofilicidad de superficie y volumen	51
3.3.	Interacción química entre las redes poliméricas	53
3.4.	Estabilidad térmica y cristalinidad	54
3.5.	Comportamiento mecánico	59

3.5.1. Tracción uniaxial y biaxial	59
3.5.2. Microindentación	64
3.6. Caracterización biológica	67
3.7. Discusión de resultados	73
Conclusión	83
Perspectiva y trabajo futuro	87
A. Sólidos hiperelásticos y su ecuación constitutiva	89
Bibliografía	99

Índice de figuras

1.1. Representación esquemática de la interacción entre las unidades básicas repetidas para formar, a) cadenas poliméricas, b) red polimérica, c) redes poliméricas interpenetradas (RPIs), d) redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs).	3
1.2. Estructura química de los tres polímeros y del entrecruzante utilizado. a)molécula del CS, b) molécula del PVA, c) molécula del GEN, d) molécula del PDMS.	13
2.1. Digrama de flujo de la preparación de las RPSIs. Las flechas en color negro indican la secuencia a seguir para la síntesis de las RPSIs.	25
2.2. Diagrama representativo del microscopio de fuerza atómica.	27
2.3. Diagrama representativo del ángulo de contacto θ que se genera al depositar una gota de líquido sobre la superficie de un material.	28
2.4. Geometría y dimensiones de la probeta usada para la prueba de tracción uniaxial de acuerdo con la norma ASTM-D1708.	33

2.5. Probador de tracción uniaxial diseñado y elaborado en el laboratorio de Mecánica y Micro-mecánica de Sólidos.	35
2.6. Diagrama del principio de funcionamiento del probador de tracción biaxial diseñado y fabricado en el laboratorio de Mecánica y Micro-mecánica de Sólidos. a) Muestra previa a ser deformada, b) Muestra deformada tras su indentación.	37
2.7. Diagrama representativo del funcionamiento del micro-indentador. a) Muestra sin deformar, b) Muestra deformada por el micro-indentador.	39
2.8. Captura de pantalla de la interfaz de usuario del <i>software</i> “CellProfiler”, y la secuencia de pasos utilizada para determinar el diámetro de Feret y la excentricidad.	44
3.1. Gráficas de los módulos de almacenamiento y pérdida obtenidos mediante pruebas reológicas para determinar el punto de gelificación; a) RPSI1 a 55 °C, b) RPSI2 a 55 °C, c) RPSI3 a 55 °C, d) RPSI3 a 25 °C	46
3.2. Diagrama representativo del arreglo de los diferentes polímeros en la formación de redes poliméricas semi-interpenetradas. . .	48
3.3. a) Valores promedio de rugosidad y espesor, con su respectiva desviación estándar. Imágenes de la topografía de las RPSIs adquiridas mediante AFM. En la esquina inferior derecha de cada figura se muestran las membranas obtenidas: b) RPSI1; c) RPSI2 y d) RPSI3. Los datos mostrados son los datos más representativos de tres experimentos independientes.	50

-
- 3.4. Hidrofilicidad de superficie y volumen de las RPSIs. a) valores promedio y desviación estándar del ángulo de contacto de cada una de las RPSIs, b) promedio y desviación estándar de la cinética de hinchamiento para cada RPSIs, c) espectro de FT-IR representativo en condiciones secas para cada RPSIs; d) espectro de FT-IR representativo en condiciones de hidratación hasta el equilibrio para cada RPSIs. 52
- 3.5. Comportamiento térmico y cristalinidad de las RPSIs. a) Curvas de estabilidad térmica de las RPSI1 obtenida mediante TGA, b) Curvas de estabilidad térmica de las RPSI2 obtenida mediante TGA, c) Curvas de estabilidad térmica de las RPSI1 obtenida mediante TGA, d) espectro de rayos-X para cada una de las RPSI. Los valores mostrados son los datos más representativos de tres experimentos independientes. 56
- 3.6. Comportamiento mecánico de cada una de las RPSIs. a) Curvas experimentales representativas de esfuerzo *vs* razón de elongación bajo tracción uniaxial y su respectivo ajuste utilizando el modelo de Mooney-Rivlin (líneas continuas), b) curvas experimentales representativas de carga *vs* deflexión bajo tracción biaxial, c) curvas experimental de carga *vs* deflexión para tracción biaxial y su respectivo ajuste lineal mediante el modelo de Garnica-Palafox (líneas continuas), d) módulo elástico promedio y desviación estándar obtenido mediante tracción uniaxial y tracción biaxial. 62
-

3.7. Caracterización mecánica por microindentación y su respectivo ajuste utilizando el modelo de Hertz a $1.6 \mu\text{m}$ de indentación y el modelo de Ogden para una distancia de $5\mu\text{m}$. a) curvas experimentales de fuerza <i>vs</i> profundidad de indentación con su respectivo ajuste no-lineal mediante el modelo de Hertz, b) curvas experimental de fuerza <i>vs</i> profundidad de indentación con su respectivo ajuste no-lineal mediante el modelo de Ogden, c) promedio y desviación estándar de los residuales del ajuste mediante el modelo de Hertz, d) promedio y desviación estándar de los residuales del ajuste mediante el modelo de Ogden.	65
3.8. Comparativa de los módulos elásticos obtenidos de las RPSIs mediante el modelo de Hertz a $1.6 \mu\text{m}$ de indentación y el modelo de Ogden para una distancia de $5\mu\text{m}$	66
3.9. Respuesta <i>in vitro</i> de los fibroblastos BJ sembrados sobre las RPSIs después de 48 horas de cultivo <i>in vitro</i> . La marca en color verde en ausencia del color rojo indica las células vivas, y el color rojo indica las células muertas. a) Material control (vidrio), b) RPSI1, c) RPSI2, d) RPSI3.	69
3.10. Distribución estadística del diámetro máximo de Feret para cada RPSIs. a) material control, b) RPSI1; c) RPSI2, d) RPSI3. El número indicado con flecha representa el diámetro máximo de Feret con mayor prevalencia.	72

-
- 3.11. a) Representación del diámetro máximo de Feret en gráficas de violín para cada una de las RPSIs. La línea central representa la mediana, y las barras en color gris representan el primer y tercer cuartil. b) Representación de la densidad celular en gráficas de violín para cada una de las RPSIs, la línea central representa la mediana, y las barras en color gris representan el primer y tercer cuartil. 73
- 3.12. Correlación de las propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas. a) Módulo de elasticidad y porcentaje de cristalinidad como función de las RPSIs; b) correlación entre la capacidad de hinchamiento y la cristalinidad de las RPSIs; c) correlación de los grupos funcionales del CS con el número de células promedio por milímetro cuadrado; d) relación entre la rugosidad y los valores promedios de la densidad celular. . . . 74
- 3.13. a) Promedio y desviación estándar del cambio de volumen de cada una de las RPSIs durante la cinética de hinchamiento, b) correlación entre el módulo elástico y el tamaño de poro. El caso uno considera el tamaño de poro como una sola red, el caso dos considera que la única red que se modifica es la red de CS/PVA/GEN y, por último, el caso tres considera que la red que se ve modificada es la del PDMS. La línea en color gris representa el ajuste no lineal para el caso dos, la línea de color azul representa el ajuste no lineal para el caso tres y la línea punteada representa la extrapolación del modelo reportado por Garnica-Palafox *et al.* 2016 [2] 77
-

3.14. Diagrama representativo de la deformación de las redes poliméricas al someterse a diferentes estímulos mecánicos. a) arreglo de la RPSI antes de someterse a deformación uniaxial, b) arreglo de la RPSI durante la prueba de tracción uniaxial, c) arreglo de la RPSI antes de ser sometidas a deformación biaxial por indentación, d) arreglo de la RPSI durante la deformación biaxial; e) Arreglo de la RPSI antes de ser sometidas a ensayos de microindentación, f) arreglo de la RPSI durante el ensayo de microindentación. 82

Índice de tablas

1.1. Marcas comerciales de sustitutos cutáneos.	9
2.1. Nomenclatura asignada, a cada una de las mezclas poliméricas y su respectiva proporción de material utilizado (masa/masa).	21
3.1. Porcentaje de masa perdida en cada intervalo de temperaturas para cada una de las RPSIs.	57
3.2. Porcentaje de cristalinidad para cada una de las RPSIs.	59
3.3. Propiedades mecánicas del PDMS, de cada una de las RPSIs y del hidrogel híbrido CS/PVA/GEN.	64

Introducción

En la actualidad el uso de los polímeros tanto naturales como sintéticos tiene un papel fundamental en nuestra cotidianidad. Dentro de las industrias más comunes que desarrollan aplicaciones con polímeros destacan la textil, la alimentaria, la de las telecomunicaciones, la de la construcción, la farmacéutica y la médica [3–5]. En la medicina, las aplicaciones van desde la ingeniería de tejidos, el recubrimiento de heridas cutáneas, la liberación de fármacos, entre otras. Dentro de los materiales utilizados para el recubrimiento de heridas cutáneas, ya sea como sustituto cutáneo o bien como modelo mecánico de la piel, se encuentran los hidrogeles y las siliconas. Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales constituidos por polímeros naturales o sintéticos entrecruzados mediante agentes físicos o químicos. Estos materiales presentan excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas. Sin embargo, existe un área de oportunidad para optimizar algunas de sus propiedades mecánicas como su módulo elástico y razón de elongación de tal manera que cubran en mejor grado las necesidades en aplicaciones tales como sustituto cutáneo [6].

Una de las siliconas comunmente utilizadas como modelo artificial de la piel es el poli(dimetilsiloxano) (PDMS, por sus siglas en inglés). El PDMS tiene una gran similitud en propiedades mecánicas con la piel; sin embargo, carece de la capacidad para absorber líquidos; característica esencial para su uso como sustituto cutáneo.

Recientemente, Morales *et. al* [7] y Chen *et. al* [8], investigaron la mezcla de PDMS con distintos hidrogeles: poli(alcohol vinílico) (PVA) y quitosano carboxilo (CC), respectivamente. Lo anterior con el fin de obtener un nuevo material capaz de combinar la hidrofiliidad de estos dos hidrogeles con la estabilidad mecánica del PDMS. No obstante, estos trabajos solo enfocan su estudio en la evaluación de ciertas propiedades mecánicas tales como: módulo elástico, esfuerzo último de tensión, módulo de almacenamiento y módulo de pérdida. En los estudios mencionados anteriormente no se considera el comportamiento que podrían tener las células cultivadas sobre el material; en particular, los fibroblastos ya que este tipo de células juega un papel crucial en la recuperación de heridas cutáneas, pues sintetizan proteínas como la colágena tipo I, III y V [9]. Este tipo de células son fáciles de aislar y cultivar, bajo protocolos estándares de cultivo celular. Conocer el comportamiento celular sobre este tipo de materiales es de gran importancia para su uso en andamios celulares, tratamientos de regeneración de piel o incluso en el recubrimiento de heridas cutáneas; por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de una nueva mezcla polimérica basada en PDMS/PVA/CS/GEN con la capacidad de emular el comportamiento mecánico de la piel humana; de tal forma que en un futuro cercano, este nuevo material pueda utilizarse como cubierta cutánea capaz de ayudar

la cicatrización de heridas cutáneas. Dicho desarrollo involucra la obtención de redes poliméricas semi-interpenetradas en donde se aprovechen de manera eficiente la estabilidad mecánica del PDMS, la buena hidrofiliidad y la gran capacidad de absorción de líquidos del PVA , la excelente citocompatibilidad y propiedad antibacteriana del quitosano entrecruzado con genipin.

A continuación, se dará una idea general sobre el contenido y la distribución de la tesis. El capítulo uno se dedica a presentar de manera detallada la problemática que motiva esta investigación, así como una revisión exhaustiva de los antecedentes del proyecto, con el fin de identificar lo que se ha realizado hasta el momento y las limitaciones o lagunas existentes en el conocimiento actual. A través de esta revisión bibliográfica, se busca establecer la base teórica con el fin de comprender la relevancia y alcance de este estudio.

En el capítulo dos, se proporciona una descripción del proceso de síntesis utilizado para la obtención de las redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs) en forma de membranas. Se detallan los materiales utilizados, los pasos a seguir y las etapas involucradas en este proceso, destacando los aspectos relevantes para la síntesis exitosa de las membranas. Además, se presenta una breve descripción de las técnicas utilizadas en la caracterización físico-química, mecánica y biológica de las membranas obtenidas.

En el capítulo tres, se exponen los resultados obtenidos a través de la caracterización físico-química, mecánica y biológica de las RPSIs. Estos resultados se presentan de manera clara y concisa, acompañados de tablas

resúmenes y material visual para su mejor entendimiento. Finalmente, la discusión permitirá correlacionar y establecer conexiones del comportamiento de los fibroblastos con cada una de las propiedades físicas y químicas evaluadas en el presente trabajo. Asimismo, se enfatiza la importancia de los resultados en relación con el objetivo general de la tesis, y se destacan posibles implicaciones y recomendaciones para futuras investigaciones.

Capítulo 1

Antecedentes

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) [10], los polímeros son sustancias macromoleculares formadas por la unión de monómeros que se unen mediante enlaces covalentes para formar cadenas largas (por lo menos 5 unidades repetidas) . Una forma de representar visualmente estas cadenas es como si fueran espaguetis, tal como se muestra en la figura 1.1 a). Cuando las cadenas poliméricas se unen entre sí mediante enlaces químicos y/o fuerzas electrostáticas (i.e enlaces covalentes, enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y/o fuerzas de Van der Waals), se obtienen redes poliméricas tridimensionales (ver figura 1.1 b). Cuando dos o más redes poliméricas independientes están entrelazadas sin que existan enlaces covalentes [10] entre ellas, da lugar a las redes poliméricas interpenetradas (RPIs). Mientras que, cuando al menos una red polimérica y una cadena polimérica están entrelazadas sin formar enlaces covalentes [10], se obtienen las denominadas redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs) tal como se muestran en las figuras 1.1 c) y 1.1 d) para las RPIs y las RPSIs,

respectivamente [3, 11]. A diferencia de otras estructuras poliméricas, como los polímeros ramificados, los polímeros en forma de estrellas y los copolímeros, las RPIs y las RPSIs se caracterizan por presentar una alta resistencia mecánica en el orden de los MPa, buena resistencia química a solventes y buena capacidad de sorción de líquidos, la cual varía dependiendo de los polímeros utilizados para formar las redes. Por tales características, las RPIs y las RPSIs son utilizadas en el área biomédica.

Entre las aplicaciones biomédicas, se encuentra la cicatrización de heridas cutáneas (*skin wound healing*). Dado que la piel es el órgano más grande del cuerpo humano y actúa como barrera protectora contra agentes externos ya sean químicos, mecánicos y/o térmicos; es susceptible de sufrir alguna lesión, lo que da lugar a las heridas. Dos de las heridas más comunes en la piel son las heridas por pie diabético y las producidas por quemaduras [12, 13].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las quemaduras son una causa importante de mortalidad y morbilidad a nivel mundial [14]. Se estima que cada año alrededor de 11 millones de personas en todo el mundo sufren quemaduras graves que requieren atención médica [14]. Adicionalmente, se reportan alrededor de 180,000 muertes anuales relacionadas con quemaduras [14].

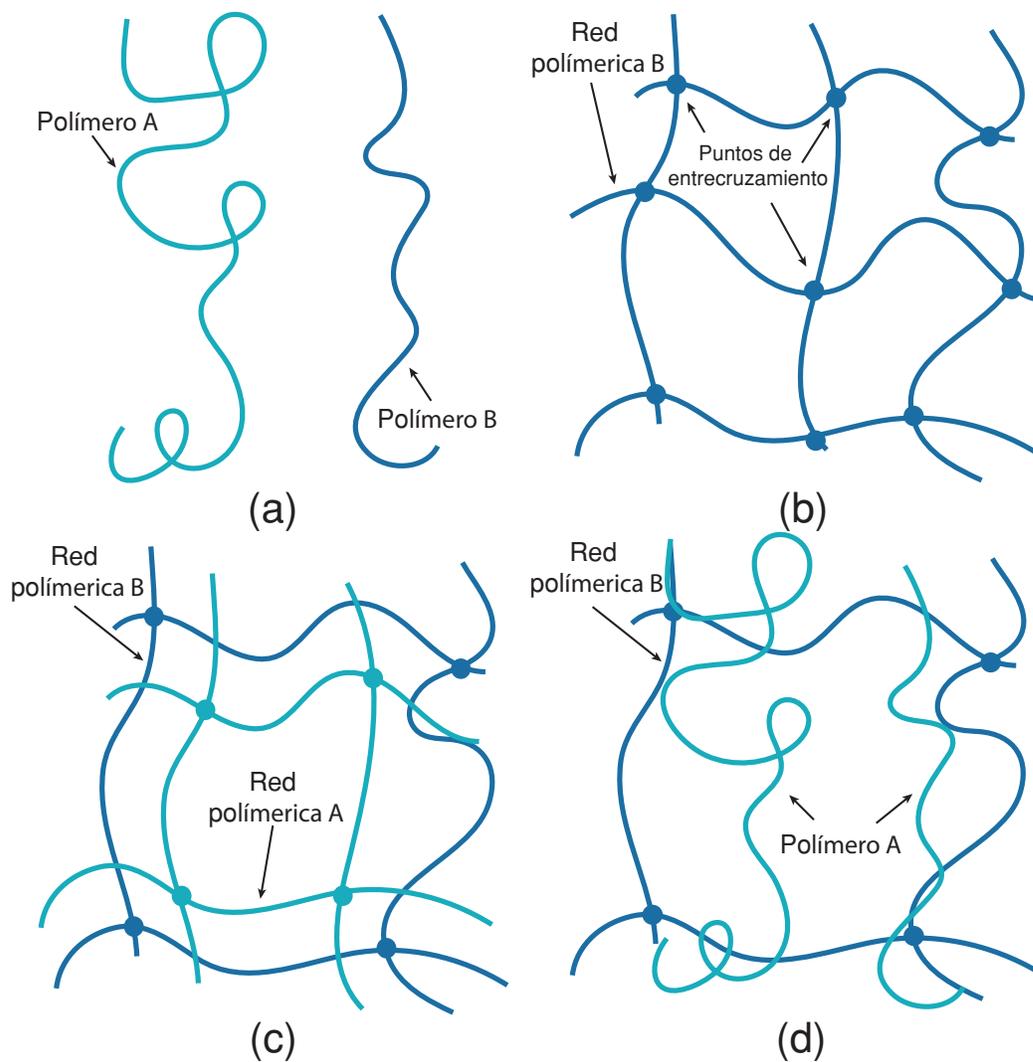


FIGURA 1.1: Representación esquemática de la interacción entre las unidades básicas repetidas para formar, a) cadenas poliméricas, b) red polimérica, c) redes poliméricas interpenetradas (RPIs), d) redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs).

Las quemaduras son lesiones que afectan la piel y los tejidos subyacentes debido a la exposición a agentes físicos, químicos, eléctricos o radiantes que provocan la destrucción o daño de las células y tejidos [15]. Los agentes que pueden causar quemaduras incluyen fuego, líquidos calientes, vapores, sustancias corrosivas, radiación solar y otras fuentes de calor intenso. En cuanto a su clasificación, la *American Burn Association* (ABA, por sus siglas en inglés) las divide en cuatro grados dependiendo de su severidad [15, 16]:

- Quemaduras de primer grado: afectan solamente a la capa más superficial de la piel (i.e. epidermis).
- Quemaduras de segundo grado: afectan tanto la primera (epidermis) como la segunda capa (dermis) de la piel. Este tipo de quemaduras puede dejar cicatrices permanentes y requieren una atención médica inmediata y especializada.
- Quemaduras de tercer grado: afectan todas las capas de la piel; es decir, la epidermis, dermis, hipodermis.
- Quemaduras de cuarto grado: afectan músculos, huesos e incluso nervios. Este tipo de quemaduras son muy graves y requieren atención médica de urgencia y especializada. En la mayoría de los casos de este tipo de quemadura, la piel sufre una grave alteración en su función.

Además de estos cuatro grados, las quemaduras también se clasifican según la extensión del área afectada (%) (TBSA, por sus siglas en inglés) como:

- Quemaduras pequeñas: afectan menos del 10 % de la superficie corporal total.
- Quemaduras medianas: afectan entre el 10 % y el 20 % de la superficie corporal total.
- Quemaduras grandes: afectan más del 20 % de la superficie corporal total.

Es importante destacar que la zona del antebrazo es una de las zonas donde se reporta una mayor incidencia de quemaduras [17, 18].

Por otro lado, la Federación Internacional de Diabetes (FID) informa que alrededor de 40 a 60 millones de personas con diabetes desarrollan úlceras en los pies en algún momento de sus vidas [19]. Las heridas por pie diabético son una complicación crónica que puede causar la aparición de úlceras o heridas en los pies que pueden ser difíciles de tratar. En casos graves, estas úlceras pueden provocar la amputación de la extremidad afectada. En cuanto a su clasificación, la escala Wagner, propuesta por William Wagner en 1981, las clasifica en seis grados [20]:

- Grado uno: úlcera superficial, sin infección ni necrosis.
- Grado dos: úlcera profunda, se extiende hasta los tendones, ligamentos, o músculos pero sin infección ni necrosis.
- Grado tres: úlcera profunda con infección en tejidos blandos, que puede afectar músculos y huesos, pero sin presencia de abscesos ni gangrena.

- Grado cuatro: úlcera profunda con abscesos y una posible infección en el hueso.
- Grado cinco: gangrena parcial del pie.
- Grado seis: gangrena total del pie.

Como se puede visualizar, tanto las quemaduras como las úlceras de pie diabético son problemas de salud graves y comunes en la actualidad. Por esta razón, la ingeniería de tejidos y la ciencia de materiales han desarrollado diversas técnicas y materiales con el objetivo de abordar esta problemática y mejorar la recuperación de las heridas [21]. En la actualidad, existen diferentes tratamientos para la cicatrización de heridas, tales como los autoinjertos, isoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. Sin embargo, el uso de estos tratamientos está limitado debido a la escasa disponibilidad de donantes de piel, el riesgo de infección o la probabilidad de rechazo [22]. Con la finalidad de superar estas limitaciones, se han desarrollado sustitutos de piel que se componen de materiales biológicos, sintéticos o una combinación de ambos.

Los sustitutos cutáneos son biomateriales celulares o acelulares que actúan como reemplazo o como cubierta temporal de lesiones en la piel acelerando el proceso de regeneración, previniendo la pérdida de fluidos y la contaminación microbiana [23]. Estos materiales se pueden clasificar dependiendo de la estructura anatómica que se pretende sustituir los cual pueden ser: epidérmicos, dérmicos y dermo-epidérmicos; además de esta clasificación, también pueden ser divididos basados en el tipo de material usado, los cuales pueden ser: biológicos (autólogos, alogénicos, xenogénicos) o bien sintéticos (biodegradables, no biodegradables)[24].

De acuerdo con la literatura [25–29], un sustituto cutáneo ideal debe satisfacer una serie de características esenciales. En primer lugar, debe ser altamente duradero y maleable, con el fin de facilitar la manipulación y prevenir daños durante su aplicación. Además, debe ser permeable a líquidos para permitir el paso de los fluidos de la herida y evitar la acumulación de éstos, lo que podría causar una posible infección. Asimismo, debe funcionar como una barrera protectora para evitar la entrada de patógenos y otros elementos externos que puedan causar infección. Por último, es importante que tenga propiedades mecánicas similares a las de la piel. En el caso de las quemaduras, una de las principales zonas afectadas por quemaduras son las manos y antebrazos [30], para esta zona el módulo elástico reportado está entre 0.5-1.12 MPa [31–33].

Entre los sustitutos cutáneos comerciales más utilizados en heridas agudas, crónicas o de espesor parcial; se encuentran: Integra, Biobrane, TransCyte y Hyalomatrix. Éstos destacan por su novedosa capa delgada de silicona que provee una barrera física contra bacterias (mayor descripción ver la tabla 1.1)[23, 34, 35]. Sin embargo, a pesar de las ventajas significativas que ofrecen estas marcas, como un tiempo medio de recuperación de heridas de 3 a 4 semanas [36–40], también presentan algunas desventajas entre las que destacan su elevado costo que van desde los 3,000 hasta los 13,000 dólares por 100 centímetros cuadrados [27, 41]. Además, existe el riesgo latente de una enfermedad por transmisión, rechazo inmunitario y acumulación de líquido en la herida, lo cual puede aumentar el riesgo de infección. [28, 35, 42].

A pesar de la basta cantidad de sustitutos cutáneos comerciales como los descritos en la tabla 1.1, aún no existe uno que sea capaz de satisfacer todos los parámetros y características del sustituto ideal. Por esta razón, los hidrogeles y los modelos artificiales de piel, los cuales se encuentran aún en proceso de investigación y desarrollo, han llamado la atención a la comunidad científica y médica para el desarrollo de materiales con mayor efectividad en el tratamiento de heridas.

TABLA 1.1: *Marcas comerciales de sustitutos cutáneos.*

Materiales	Descripción	Desventajas	Referencias
Integra	Este material consiste en dos capas, la primera consta de una matriz de colágeno bovino y condroitín-6-sulfato; la segunda capa es una lámina de silicona de 100 μm de espesor, la cual simula la dermis.	No permite el exudado de fluidos, carece de componentes epidérmicos, dificultad de adherencia a la herida.	[21, 35, 43–46]
Biobrane	Está conformado de dos capas, la primera capa está compuesta de una red de nailon entretejido sobre las cuales se encuentran péptidos de colágeno porcino y la segunda capa de silicona que actúa como barrera epidérmica.	Riesgo de infección, se adhiere mucho a la herida.	[21, 35, 46–49]
TranCyte	Este material está compuesto de dos capas, la primera de fibroblastos neonatales sobre una malla de nailon, y la segunda de una capa delgada de silicón la cual funciona como barrera para la herida.	Solución temporal y costo muy elevado.	[21, 35, 44, 50]
Hyalomatrix	Este material se considera como un sustituto dérmico sintético creado a partir de ácido hialurónico y benzoato de bencilo con una membrana de silicón semipermeable.	Riesgo de infección	[21, 35, 45, 51–53]

1.1. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas semi o interpenetradas que se caracterizan principalmente por su gran capacidad de sorción de líquidos, así como por su estabilidad química, física y su uso potencial en aplicaciones biomédicas.

Algunos de los polímeros utilizados para la formación de hidrogeles con aplicaciones biomédicas son: ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) [54, 55]; ácido hialurónico (HA) [56]; gelatina [55]; poli(alcohol vinílico) (PVA) [2, 57]; quitosano (CS) [2, 58–60]. A pesar de que estos polímeros presentan buena biocompatibilidad, por sí solos se ven limitados en sus propiedades mecánicas para su aplicación como sustituto dérmico. Por tal motivo, se han realizado combinaciones de polímeros naturales y sintéticos, lo que da lugar a los denominados hidrogeles híbridos [2, 57, 61]. Para la formación de hidrogeles híbridos, se utilizan diversos polímeros, entre los cuales destacan el quitosano (CS) y el poli(alcohol vinílico) (PVA)[57, 61, 62]. La formación de redes poliméricas con la combinación de estos dos polímeros es especialmente interesante debido a su buena compatibilidad biológica y a que son fácilmente accesibles y asequibles.

El quitosano es un polisacárido lineal formado por N-glucosamina y N-acetilglucosamina, las cuales se unen mediante enlaces glucosídicos β (1-4) (ver molécula en la figura 1.2 a)) [63]. Este polímero natural se obtiene mediante la desacetilación de la quitina en condiciones alcalinas, siendo esta

última un polisacárido muy abundante que se encuentra en el exoesqueleto de invertebrados como artrópodos, moluscos y anélidos, además de algas y hongos [64]. Gracias a sus grupos amino reactivos, el quitosano es el único polímero natural catiónico, lo que quiere decir que presenta cargas iónicas positivas que facilitan su interacción con moléculas o estructuras con cargas negativas (i.e lípidos, proteínas e iones metálicos). Así pues, la estructura del quitosano puede presentar interacciones electrostáticas con las membranas celulares de los microorganismos [65], y otorgarle propiedades antimicóticas, antibacterianas, antimicrobianas; además, de poseer cualidades anticoagulantes y hemostáticas [62, 66–68]. Este conjunto de propiedades proveen al CS un micro-ambiente adecuado para promover la rápida regeneración de heridas [69–71]. Adicionalmente, la estructura química del quitosano es similar a la estructura de los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular de la piel, lo cual beneficia la adhesión y la proliferación celular de células sembradas sobre el polímero [72]. Aunque este material ha sido ampliamente utilizado gracias a todas las ventajas biológicas que presenta, aún es necesario incrementar las propiedades mecánicas del CS como el módulo de elástico o su razón de elongación, para esto, este polímero se ha combinado con el PVA y con el genipin para formar hidrogeles híbridos con una estructura de red polimérica semi-interpenetrada [73].

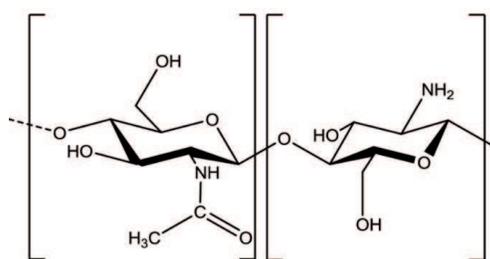
El PVA es un polímero sintético con características hidrófilas debido a los grupos hidroxilo (OH) contenidos en su estructura molecular -ver molécula en la figura 1.2 b)-. Debido a este grupo funcional, este polímero es fácil de combinar con otras cadenas de PVA o con otros polímeros. Dentro de las

aplicaciones biomédicas, el PVA ha demostrado su versatilidad en diversas aplicaciones como en el reemplazo de cartílago [74], en el andamiaje de hueso [75], y en la liberación controlada de fármacos [76]. Todos esto debido a su buena elasticidad, su capacidad de absorción de agua y su baja citotoxicidad.

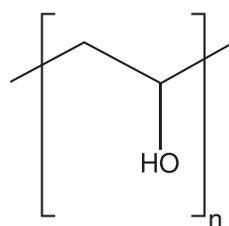
Por su parte, el genipin (GEN) es una aglicona presente en el extracto de la *Gardenia Jasminoides Ellis* y se obtiene mediante la hidrólisis enzimática de la geniposida (glicósido iridoide presente en el fruto de esta planta)[77] (ver molécula en la figura 1.2 c)). Este compuesto se utiliza como entrecruzante natural, el cual reacciona con las aminas primarias del quitosano. Este compuesto tiene la propiedad de ser entre 5,000 a 10,000 veces menos tóxico que el glutaraldehído (GA) [78, 79], entrecruzante que se ha utilizado para brindarle estabilidad mecánica a hidrogeles de PVA. Por las características mencionadas previamente, el GEN se utiliza en la producción de hidrogeles híbridos [2], en terapia contra el cáncer [80] y en la regeneración de cartílago articular [81], entre otros usos.

En este contexto, en el 2020 Garnica-Palafox *et al.* obtuvieron membranas de la red polimérica semi-interpenetrada CS/PVA/GEN estructuralmente estables con buenas propiedades físicas, químicas y térmicas. Adicionalmente, comprobaron que la RPSI no presenta efectos citotóxicos, y es capaz de promover la adhesión y proliferación celular [82]. Dadas las propiedades fisico-químicas y la respuesta de la mezcla CS/PVA/GEN en un entorno biológico, este material puede ser considerado para su posible uso en el desarrollo de un material que emule el comportamiento de la piel humana. Sin embargo, aún existe la necesidad de modificar sus propiedades mecánicas, (en especial el módulo elástico que para la piel en la zona del antebrazo está entre 0.5-1.12

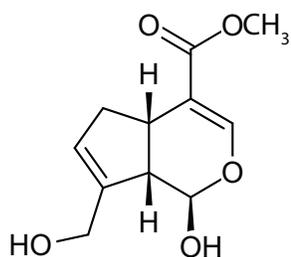
MPa y el módulo de elasticidad del hidrogel híbrido es de 2 MPa) con el fin de igualar el comportamiento mecánico de la piel humana. Cabe enfatizar que el módulo elástico es una característica esencial para el desarrollo de sustitutos cutáneos.



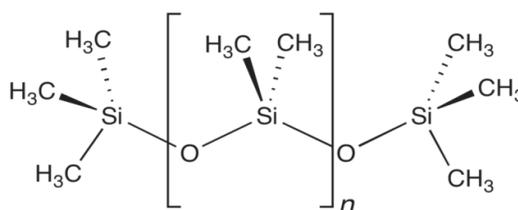
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 1.2: Estructura química de los tres polímeros y del entrecruzante utilizado. a) molécula del CS, b) molécula del PVA, c) molécula del GEN, d) molécula del PDMS.

1.2. Modelos artificiales de piel

Los modelos artificiales de piel son materiales que tratan de simular o igualar diferentes propiedades de la piel humana, como por ejemplo: la morfología, la habilidad sensorial, la textura y las propiedades mecánicas, entre otras [83]. En años recientes, diversas investigaciones han utilizado polímeros sintéticos como las siliconas y los poliuretanos con el fin de simular y describir las propiedades mecánicas o parámetros de interés de la piel como el módulo de elasticidad, la rigidez, la deformación y el esfuerzo máximo a la ruptura [8]. En el presente trabajo una de las características de interés a simular es el módulo de elasticidad, por tal motivo nos enfocaremos en esta propiedad mecánica.

Entre las siliconas de mayor aplicación en el área biomédica, se destaca el poli(dimetilsiloxano) (PDMS). El PDMS es un polímero sintético que consiste en cadenas de silicio-oxígeno, con grupos metilo (CH_3) que se unen directamente al silicio. (ver molécula en la figura 1.2 d)). Este polímero es químicamente inerte, térmicamente estable, transparente, hidrofóbico, permeable a gases y de bajo costo [84]. Por esta razón el PDMS se ha combinado con el PVA para obtener un material que asemeje el comportamiento de la piel humana.

En el 2015 Morales-Hurtado y colaboradores [7] estudiaron la red polimérica interpenetrada basada en PDMS y PVA entrecruzado con GA. En este estudio, se demostró que fue posible aumentar la hidrofiliidad del PDMS

en función del contenido de PVA, además se reportaron propiedades mecánicas similares a la piel del antebrazo humano. No obstante, la principal desventaja de esta RPIs para ser considerada como un sustituto cutáneo es que se ha observado que, por sí solos, ninguno de estos dos polímeros promueve fácilmente la adhesión celular, además de que el uso de glutaraldehído tiene efectos citotóxicos [61, 62, 85, 86]. Más adelante, en el 2019, Chen y colaboradores [8] utilizaron la red polimérica semi-interpenetrada basada en PDMS/quitosano carboxilo con el fin de obtener un material que pudiera servir como modelo para entender el comportamiento mecánico de la piel. Este estudio reveló que el material tiene propiedades mecánicas similares a la piel del antebrazo humano. Aunque estos materiales presentan propiedades mecánicas similares a la piel, no se pueden considerar actualmente para su uso como cubierta dérmica o andamio celular (*scaffold*) en la regeneración de piel. Esto debido a que no se ha estudiado el comportamiento de diferentes tipos de células cultivadas sobre el material, en particular, los fibroblastos. Este tipo de células desempeñan un papel importante en la recuperación de heridas, ya que éstas sintetizan colágeno tipo I, III y V [9], proteína con mayor abundancia en la piel (entre el 50 y 70 %) [87].

En el 2019, en la tesis de maestría de Benítez-Martínez se desarrolló exitosamente la red polimérica semi-interpenetrada basada en PDMS/CS/PVA entrecruzada con genipin [88]. Este estudio evaluó la respuesta físico-química de esta RPSIs en un proporción 7:3, donde 7 partes corresponden al PDMS y 3 partes de la mezcla CS/PVA/GEN. Además, se determinó que dicha RPSI presenta un módulo elástico de 0.8 ± 0.14 MPa, que de acuerdo con estudios previos es similar al módulo de elasticidad para la piel humana en

la zona del antebrazo (0.5 - 1.12 MPa) [31–33]. Este trabajo concluyó que la RPSI de PDMS/CS/PVA/GEN puede ser un candidato posible en aplicaciones biológicas como en el recubrimiento de heridas. Sin embargo, aún es necesario una mejor optimización del módulo elástico y la respuesta biológica mediante la variación de las proporciones de los diferentes componentes.

Actualmente, este trabajo es el único en la literatura que estudia la mezcla de PDMS/CS/PVA/GEN por lo que es necesario realizar una investigación más exhaustiva para obtener una comprensión más detallada sobre la influencia de la proporción de cada polímero en la composición de la RPSI sobre el comportamiento físico, químico y biológico .

Por tal motivo, este proyecto doctoral se centró en obtener un nuevo material polimérico que, mediante la combinación del PDMS, CS, PVA y el genipin, potencie tanto sus características físico-químicas como biológicas. Por tanto, se plantea la siguiente hipótesis y se proponen los siguientes objetivos.

1.3. Hipótesis y Objetivos

1.3.1. Hipótesis

Al variar las proporciones de PDMS y de la mezcla CS/PVA/GEN se lograrán modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs). Con esto, se espera obtener una RPSI citocompatible que sea capaz de emular el comportamiento mecánico

de la piel humana.

1.3.2. Objetivos

1.3.2.1. Objetivo general

Desarrollar redes poliméricas semi-interpenetradas basadas en PDMS/CS/PVA entrecruzadas con genipin capaces de emular la respuesta mecánica de la piel humana y evaluar la interacción de las redes poliméricas en un entorno biológico *in vitro*.

1.3.2.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de las distintas proporciones del PDMS y CS/PVA/GEN (7:3, 5:5 y 3:7) sobre la estructura química y las propiedades físicas de las RPSIs a través de las técnicas: microscopía de fuerza atómica, ángulo de contacto, hinchamiento, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, análisis termogravimétrico, y difracción de rayos X.
- Evaluar el efecto que tienen las distintas proporciones del PDMS y CS/PVA/GEN sobre las propiedades mecánicas: módulo elástico, esfuerzo a la ruptura, deformación máxima a través del ensayo de tracción uniaxial, tracción biaxial por indentación esférica y micro-indentación.
- Evaluar la citocompatibilidad de las distintas proporciones de PDMS y CS/PVA/GEN.
- Analizar y comparar el efecto que tiene el módulo elástico, la hidrofili-
cidad de superficie, la disponibilidad de los grupos funcionales del CS,
y la rugosidad sobre la densidad celular.

Capítulo 2

Metodología y técnicas experimentales

En el presente capítulo se expone a detalle el proceso para la síntesis de las redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs). Las cuales están compuestas principalmente de poli(dimetilsiloxano) (PDMS), quitosano (CS) entrecruzado con genipin (GEN) y poli(alcohol vinílico) (PVA). Asimismo, se presenta una breve descripción de las técnicas utilizadas en la caracterización de las propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas de las RPSIs. Cabe resaltar que, tanto la síntesis y caracterización fisicoquímica y mecánica se realizó en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM,UNAM); mientras que las pruebas de viabilidad celular y citotoxicidad celular se llevaron a cabo en colaboración con el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

2.1. Materiales

Para la síntesis de las mezclas, se utilizaron los siguientes materiales: poli(dimetilsiloxano) (PDMS) de Dow Corning (Sylgard kit 184; EUA); poli(alcohol vinílico) (PVA) con un peso molecular promedio peso (M_w) de 89,000 - 98,000 y un porcentaje de hidrólisis mayor al 99 % (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA); ácido acético grado HPLC (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA); quitosano (CS) con un peso molecular medio de 190,000 - 310,000 y un porcentaje de desacetilización entre el 75 y 85 % (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA); genipin grado analítico (GEN)(Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) y agua desionizada.

2.2. Preparación de las redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs)

En este trabajo de investigación se estudiaron tres mezclas con diferentes proporciones (masa/masa) de PDMS y del hidrogel híbrido CS/PVA/GEN. Dichas proporciones se describen en la tabla 2.1.

TABLA 2.1: *Nomenclatura asignada, a cada una de las mezclas poliméricas y su respectiva proporción de material utilizado (masa/masa).*

Etiqueta de la mezcla	Proporción de PDMS	Proporción de CS/PVA/GEN
RPSI1	7	3
RPSI2	5	5
RPSI3	3	7

Las redes poliméricas semi-interpenetradas en forma de membranas fueron preparadas mediante la técnica de evaporación de disolventes y se divide en tres principales etapas. La primera etapa consiste en preparar la mezcla CS/PVA/GEN. En la segunda etapa se prepara el PDMS en una relación 10:1 (masa/masa) con su agente entrecruzante (proporción comúnmente utilizada en investigaciones biomédicas [89] y en el cultivo de células [90]). Por último, se combinan ambas mezclas en las diferentes proporciones (masa/masa) descritas en la tabla 2.1.

2.2.1. Mezcla CS/PVA/GEN

La síntesis de la mezcla CS/PVA se llevó a cabo de la siguiente manera. Primero se preparó una disolución al 2.5 % (masa/volumen), la cual se obtuvo disolviendo el CS (en polvo) en una disolución de ácido acético al 1 % (volumen/volumen). Esta disolución se mantuvo bajo agitación magnética constante a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 horas. Posteriormente, se preparó una disolución de PVA al 10 % (masa/volumen) disolviendo el PVA (en polvo) en agua desionizada. La disolución se mantuvo bajo agitación

magnética durante una hora a 80°C, después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente manteniendo la agitación magnética por una hora más. Una vez que las dos soluciones poliméricas estuvieron listas, se mezclaron cuidadosamente a una la relación volumétrica 3:1 CS/PVA. Esta mezcla se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente por una hora. Subsecuentemente, se incorporó lentamente el genipin previamente disuelto en agua desionizada a una concentración al 1% (masa/volumen) y se mantuvo en agitación magnética por una hora más a temperatura ambiente, de modo que la concentración final de GEN en la mezcla CS/PVA/GEN con respecto a los solutos fue del 1% (masa/masa). De acuerdo con Muzzarelli [91] y Garnica-Palafox [92], esta concentración de genipin permite un entrecruzamiento efectivo del CS.

2.2.2. Preparación de la disolución PDMS/CS/PVA/GEN

La preparación del PDMS se realizó mediante la mezcla de los dos componentes contenidos en el kit PDMS SYLGRAD 184 de la marca Dow Corning; dicho polímero consta de dos líquidos [93]; el primer líquido denominado precursor o base (parte A) y el segundo líquido, el cual funciona como agente curante o agente entrecruzante (parte B). Cuando estos dos componentes se mezclan se forma una reacción de entrecruzamiento, para posteriormente tener un elastómero flexible. En este trabajo se utilizó una relación 10:1 (masa/masa) (base:agente curante); esta mezcla se agitó mecánicamente durante cinco minutos a 25 °C. Subsecuentemente, se mezcló el PDMS con el CS/PVA/GEN en las proporciones (masa/masa) descritas en la tabla 2.1 y se agitó mecánicamente durante dos minutos a temperatura ambiente.

2.2.3. Determinación de punto de gelificación de las RPSIs.

El tiempo máximo de manipulación de la mezcla y la temperatura de entrecruzamiento de las membranas se determinaron mediante pruebas reológicas. Estas pruebas nos permitieron conocer el punto de gelificación de cada una de las mezclas, lo cual es importante ya que determina el tiempo en el que el proceso de moldeo debe realizarse mientras la mezcla polimérica aún es capaz de fluir [94].

Las pruebas reológicas se realizaron con el equipo AresG2 (TA instruments), utilizando una geometría de platos paralelos de titanio con un diámetro de 25 mm. La prueba se dividió en dos etapas: primero, aproximadamente 3 mL de las mezclas poliméricas, en estado líquido se sometieron a una curva de calentamiento con velocidad de 2 °C/ min desde la temperatura ambiente a 55 °C (temperatura utilizada para el curado de la mezcla PDMS/CS/PVA/GEN). Una vez alcanzada los 55 °C, se llevó a cabo un barrido de oscilación tiempo con una frecuencia de 1 Hz. y una deformación de 0.05 % durante tres horas. Estos parámetros se utilizaron para garantizar que se trabaja en la zona de viscoelasticidad lineal, es decir que los módulos de almacenamiento y pérdida no dependan de la deformación ni de la frecuencia y solo dependan de la temperatura a medida que transcurre el tiempo. Los datos obtenidos se procesaron y analizaron con el *software* mathematica 13.0.

2.2.4. Síntesis de las RPSIs en forma de membranas

La elaboración de las RPSIs en forma de membranas se realizó como se describe a continuación: primero, las mezclas poliméricas se centrifugaron a 5000 *rpm* durante 10 minutos con el fin de retirar cualquier burbuja de aire

presente en las mezclas. Luego, las mezclas se vaciaron en moldes cuadrados de PLA impresos en 3D , fijados con cinta doble cara a un tapete de Polipropileno. Considérese que los moldes cuadrados fueron diseñados en un ambiente CAD e impresos en una impresora marca Flash Forge Creator PRO. Para la impresión de los moldes 3D se utilizó una velocidad de impresión del extrusor de 60 mm/s , una temperatura de impresión de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ y una temperatura de plataforma de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Las dimensiones de estos moldes fueron $60 \times 60 \text{ mm}$ y 0.5 mm de espesor. Una vez que la mezcla se vació en los moldes (5 mL de la disolución), se esparció homogéneamente en todo el molde con la técnica *Doctor Blade*¹. Finalmente, los moldes se introdujeron al horno a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Por último, se retiraron del horno, se desmoldaron, etiquetaron y se almacenaron en un desecador hasta ser ensayadas por las diferentes técnicas de caracterización.

¹La técnica de *Doctor Blade* consiste en pasar una navaja sobre el sustrato con la disolución, con el fin de distribuir la disolución de manera homogénea sobre el sustrato

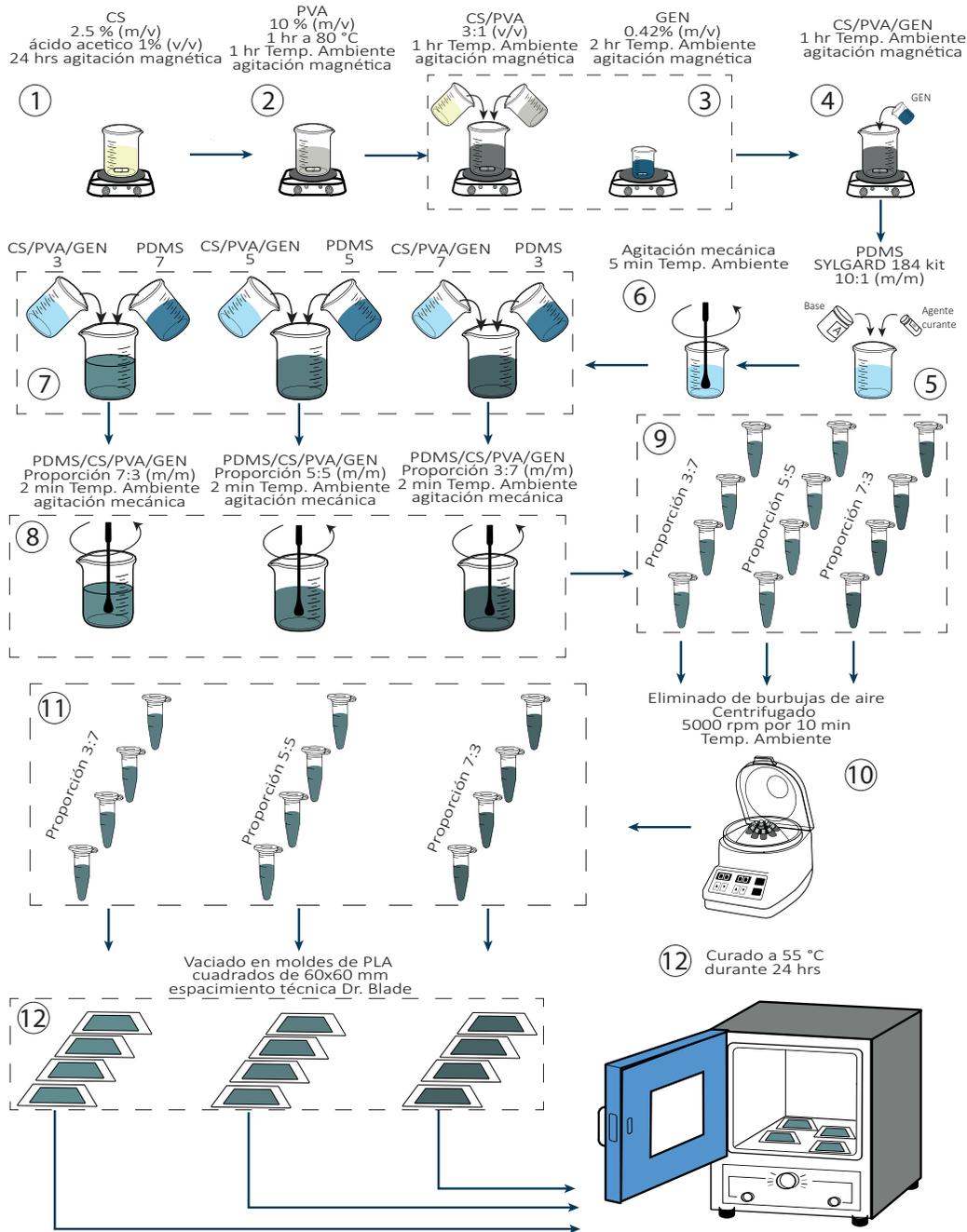


FIGURA 2.1: *Digrama de flujo de la preparación de las RPSIs. Las flechas en color negro indican la secuencia a seguir para la síntesis de las RPSIs.*

2.3. Caracterización fisicoquímica

El principal objetivo de la caracterización fisicoquímica se centra en correlacionar las propiedades abajo mencionadas con las diferentes proporciones de PDMS y CS/PVA/GEN presentes en las diferentes RPSIs. La caracterización de hidrofiliidad de superficie y de volumen, se realizó a través de los ensayos de ángulo de contacto e hinchamiento, respectivamente. La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se utilizó para detectar los principales cambios en la estructura química de las RPSIs. Con la microscopía de fuerza atómica (AFM) se midieron las rugosidades de cada una de las RPSIs. La estabilidad térmica de las RPSIs se determinó a través de la técnica análisis termogravimétrico. Por último, el comportamiento mecánico de las RPSIs, en forma de membrana, fueron ensayadas a través de tracción uniaxial, tracción biaxial por indentación y microindentación.

A continuación, se describirá brevemente cada una de estas técnicas contemplando sus parámetros de medición y sus principales contribuciones al conocimiento de las RPSIs desarrolladas en el presente trabajo.

2.3.1. Topografía de la superficie de las membranas

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica comúnmente utilizada para obtener una medida cuantitativa de la rugosidad del material en orden de nm . Este instrumento de medición, genera imágenes de la topografía superficial del material mediante la flexión que ocurre en el cantilever debido a la interacción entre la punta y la superficie del material (ver figura 2.2).

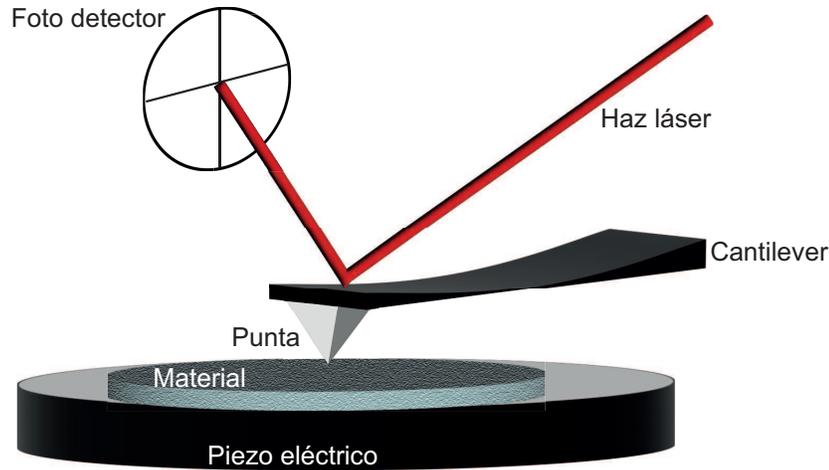


FIGURA 2.2: Diagrama representativo del microscopio de fuerza atómica.

En este trabajo, las mediciones se realizaron en el laboratorio de microscopía de fuerza atómica en las instalaciones del IIM; para esta prueba se utilizó el microscopio de fuerza atómica modelo Naio-AFM de la marca Nanosurf. Las imágenes se adquirieron utilizando una punta de silicio con un revestimiento reflejante de aluminio (ContAl-G). Dicha punta tienen un diámetro de 10 nm y una constante de resorte de 0.2 N/m. Las mediciones se realizaron con una frecuencia de resonancia de 13 kHz, en modo de operación estático (i.e modo de contacto), en tres diferentes muestras por material, a temperatura ambiente y con las RPSIs en estado seco. El área escaneada fue de $5 \times 5 \mu\text{m}$ para todas las mediciones. Posteriormente, los datos obtenidos se procesaron en el *software* Naio Control 3.10 para calcular sobre toda el área la rugosidad media cuadrática (S_q). Esta rugosidad se define como la desviación estándar en una distribución de crestas y valles, esto hace que esta medida sea más sensible que la rugosidad media aritmética, la cual se define como la media aritmética en una distribución de valles y crestas [95].

2.3.2. Hidrofilicidad de superficie y volumen

En este trabajo, la prueba de ángulo de contacto nos permitió determinar la mojabilidad de los materiales es decir, que tan hidrófila o hidrófoba es la superficie de un material. Para este caso, el ángulo de contacto (ángulo que se forma por la intersección líquido/sólido y la tangente a la interfase líquido/gas cuando una gota de agua es colocada en la superficie de un material, ver figura 2.3), se midió por triplicado en cada RPSI a temperatura ambiente. Cabe resaltar que las RPSIs fueron previamente hidratadas al equilibrio en agua desionizada. La prueba se realizó por triplicado mediante el método de gota sésil. Para esto, se depositó cuidadosamente una gota de agua desionizada ($5 \mu\text{L}$) sobre la superficie de cada muestra. Luego, se tomó una secuencia de imágenes con una cámara CCD y se almacenaron en la memoria de la computadora a través de un instrumento virtual programado en LabView 2016. Luego, las imágenes de la gota inmediatamente después de ser depositada se analizaron con el *software* Vision Assistant 2016 y se midió el ángulo tangente al punto de contacto trifásico por ambos lados del perfil. Por último, se calculó el ángulo de contacto promedio y su desviación estándar para cada una de las RPSIs.

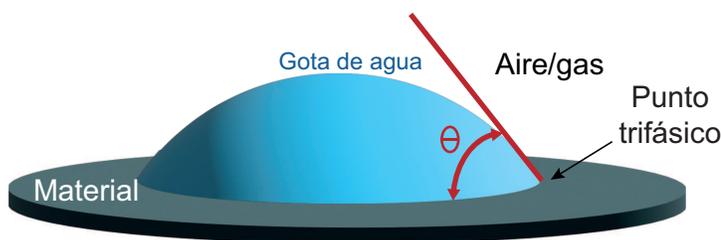


FIGURA 2.3: Diagrama representativo del ángulo de contacto θ que se genera al depositar una gota de líquido sobre la superficie de un material.

La hidrofiliidad de volumen se evaluó mediante la inmersión en agua desionizada a un tiempo específico como se reporta en la literatura [2]. Primero se pesó cada muestra en estado deshidratado, luego cada una de las muestras se sumergió en 5 mL de agua desionizada durante 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 320, 1440 y 2880 minutos. Después de cada tiempo se retiraron del agua quitando el exceso de líquido de la superficie del material cuidadosamente con un papel filtro y se pesaron en una balanza analítica. Debido a que en estudios previos se ha observado que algunos materiales aún no alcanzaron el equilibrio a los tiempos mencionados anteriormente, los materiales se dejaron hasta que se observó la estabilidad de absorción, tomando datos de masa al día 3,4,5,7,10 y, posteriormente, cada 5 días hasta que alcanzó la estabilidad.

El porcentaje de hinchamiento se calculó mediante el cambio de peso utilizando la ecuación 2.1 [96]. Donde Q es el porcentaje del líquido atrapado en la red, w_f es el peso del polímero después de cierto tiempo de inmersión en el agua y w_0 es el peso del polímero deshidratado.

$$Q(\%) = \frac{w_f - w_0}{w_0} \times 100\% \quad (2.1)$$

2.3.3. Interacción química de las RPSIs utilizando la espectroscopía FT-IR

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica ampliamente utilizada para estudiar la estructura química de los polímeros, identificar compuestos desconocidos o bien para analizar los grupos funcionales presentes en el material. Esta técnica mide la absorción de radiación

en el rango infrarrojo ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) por las moléculas presentes en el material. Esta radiación induce transiciones vibracionales características de los átomos del material expuesto a la radiación. En esta investigación, se caracterizó las RPSIs mediante FTIR con el fin de identificar los grupos químicos presentes en la mezcla (PDMS/CS/PVA/GEN). Para ello, se utilizó el equipo Spectrum GX de Perkin-Elmer montado con un sistema de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante, se realizaron 32 barridos en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} y con una resolución de 4 cm^{-1} .

Con el fin de observar la presencia del agua absorbida por las diferentes membranas, el estudio se realizó en estado deshidratado e hidratado al equilibrio; para dicho estudio se utilizaron muestras de los materiales con un espesor de $500\text{ }\mu\text{m}$ aproximadamente. Posteriormente, con el fin de asociar, identificar y diferenciar cada uno de los grupos funcionales presentes en cada material, los espectros obtenidos se graficaron y compararon. De acuerdo con la literatura, para llevar a cabo una comparación apropiada, es esencial normalizar los espectros de FTIR en relación a una banda que no experimente variaciones en la intensidad de absorbancia o transmitancia [97]. En este estudio, los espectros de FTIR obtenidos se normalizaron utilizando la banda de 1257 cm^{-1} como referencia, ya que esta banda no presenta variación en los valores de transmitancia.

2.3.4. Estabilidad térmica, cristalinidad de las RPSIs

La estabilidad térmica de las RPSIs se determinó mediante la técnica de análisis termogravimétrico (TGA). Esta técnica nos permite medir el porcentaje en pérdida de peso y su rapidez de cambio de una muestra en función del incremento de temperatura en una atmósfera controlada. En el presente trabajo, se utilizó una balanza termogravimétrica modelo Q5000 IR de TA instruments. La prueba se realizó por triplicado en un intervalo de temperatura desde temperatura ambiente (25 °C) hasta 700°C con una velocidad de calentamiento de acuerdo a la norma ASTM E1131-08 para elastómeros de 10 °C min⁻¹ y en una atmósfera controlada de nitrógeno con el propósito de evitar reacciones de oxidación y así evaluar únicamente la descomposición térmica. Los datos obtenidos fueron procesados y analizados utilizando los *softwares* TA Instruments Universal Analysis 2000 y mathematica.

La cristalinidad de las RPSIs fue calculada mediante la difracción de rayos X (DRX). Estas pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Difracción de rayos X del IIM; en el difractómetro marca Bruker D8 Advanced. Las pruebas se realizaron por triplicado en forma de membrana con un ánodo de Cu a 45 kV en un intervalo de $2\theta=9^{\circ}$ - 40° , un paso de 0.02° y una velocidad de 0.4° seg⁻¹. Posteriormente, el porcentaje de cristalinidad se determinó a partir de los difractogramas de las membranas a través de la ecuación 2.2 [2, 98], donde A_c y A_a corresponden a las áreas bajo la curva de las zonas cristalinas y amorfas, respectivamente. Para el procesamiento de los datos se utilizó el *software* Evaluation 11.0 del paquete Diffract Plus 2005.

$$C_r(\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100\% \quad (2.2)$$

2.4. Comportamiento mecánico de las RPSIs

La prueba de tracción uniaxial y tracción biaxial son dos de las pruebas mecánicas típicas para determinar los parámetros mecánicos de mayor relevancia de los materiales; dentro de estos parámetros se encuentran: el módulo elástico, la deformación máxima, el módulo de corte, el esfuerzo último a la ruptura y la tenacidad. El conocimiento de estos parámetros es de suma importancia para el diseño y funcionamiento de las RPSIs desarrolladas; lo anterior debido a que para una aplicación como cubierta cutánea, es necesario que el material sea estable mecánicamente (i.e. con buena flexibilidad y capacidad de estiramiento) para su fácil manipulación al momento de colocar o de retirar la cubierta. Adicional a esto, una cubierta cutánea debe presentar elasticidad y flexibilidad adecuada para poderse adaptar a cualquier sitio anatómico en donde se presente la herida y, por último, debe poseer propiedades mecánicas similares al tejido en el cual será colocado [57, 99, 100].

2.4.1. Tracción Uniaxial

Dado que las RPSIs desarrolladas contienen un hidrogel híbrido y la mayoría de los hidrogeles cambian su comportamiento mecánico en estado hidratado y se comportan como sólidos hiperelásticos, los ensayos de tracción uniaxial se realizaron por triplicado, a temperatura ambiente (aproximada-

mente 25 °C) y bajo condiciones de hidratación (i.e. se hidrataron en agua desionizada hasta el equilibrio). Para esta prueba se utilizaron probetas con forma y dimensiones de acuerdo con la norma ASTM-D1708 (ver figura 2.4). Las dimensiones de dicha probeta (i.e. ancho “w”, espesor “t”) se midieron utilizando un micrometro MDC-1-SXF de la marca Mitutoyo y un calibrador digital CD-6 CS de la marca Mitutoyo, respectivamente. Estas dos medidas se utilizaron para determinar el área de la sección transversal de la probeta (A_t), con la cual se calculó el esfuerzo definido como $\sigma = f/A_t$, donde f es la fuerza de tracción aplicada a la probeta para deformarla.

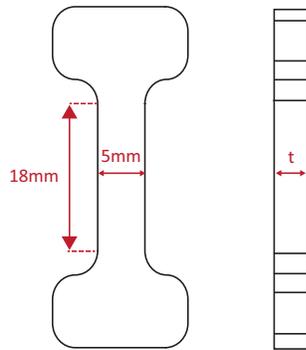


FIGURA 2.4: Geometría y dimensiones de la probeta usada para la prueba de tracción uniaxial de acuerdo con la norma ASTM-D1708.

Para esta prueba se utilizó un probador de tracción uniaxial diseñado y elaborado en el laboratorio de mecánica y micro-mecánica de sólidos (figura 2.5). Con una velocidad de desplazamiento de 0.16 mm/s de acuerdo con la norma ASTM D882. Para el control y la adquisición de datos se utilizaron tarjetas de National Instruments a través de un instrumento virtual programado en LabView. De los datos adquiridos se obtuvieron curvas de esfuerzo-razón de elongación para cada RPSI. Puesto que las curvas obteni-

das para las RPSIs tienen un comportamiento no lineal, no es adecuado usar la ley de Hooke para determinar el módulo elástico. Por tal motivo es necesario utilizar diferentes modelos constitutivos para estudiar el comportamiento mecánico de estos materiales. Entre los modelos constitutivos para materiales hiperelásticos existen los fenomenológicos propuestos por diferentes autores entre los que destacan Treloar [101], Green-Adkins [102], Yeoh[103], Rivlin [104], Mooney [105], y Ogden [106]. Para el ajuste de los datos experimentales previamente obtenidos, se seleccionó el modelo de Mooney-Rivlin de tercer orden [104, 105], el cual describe de mejor manera el comportamiento mecánico para materiales con un punto de inflexión en su curva esfuerzo-razón de elongación y hasta un 200 % de deformación [107].

$$\begin{aligned}\sigma = & 2C_{10} \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) + 2C_{01} \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^3} \right) \\ & + 6C_{11} \left(\lambda^2 - \lambda - 1 + \frac{1}{\lambda^2} + \frac{1}{\lambda^3} - \frac{1}{\lambda^4} \right)\end{aligned}\quad (2.3)$$

Donde σ esta definido como el esfuerzo ingenieril, en Pa, λ es la razón de elongación; C_{10} , C_{01} , and C_{11} son los coeficientes que definen la forma de la curva de esfuerzo-razón de elongación. De aquí que, de acuerdo con la literatura el módulo elástico puede ser calculado como el límite cuando $\lambda \rightarrow 1$ de la derivada parcial del esfuerzo con respecto a la razón de elongación: $E = \lim_{\lambda \rightarrow 1} \frac{\partial \sigma}{\partial \lambda}$ [108]. Así pues, considerando el modelo de tercer orden ecuación 2.3, el módulo elástico de cada una de las RPSI se calculó como: $E = 6(C_{01} + C_{10})$. En el apéndice A se muestra un mayor desarrollo de las ecuaciones constitutivas para un material hiperelástico, isotrópico, así como el modelo

de Mooney-Rivlin.

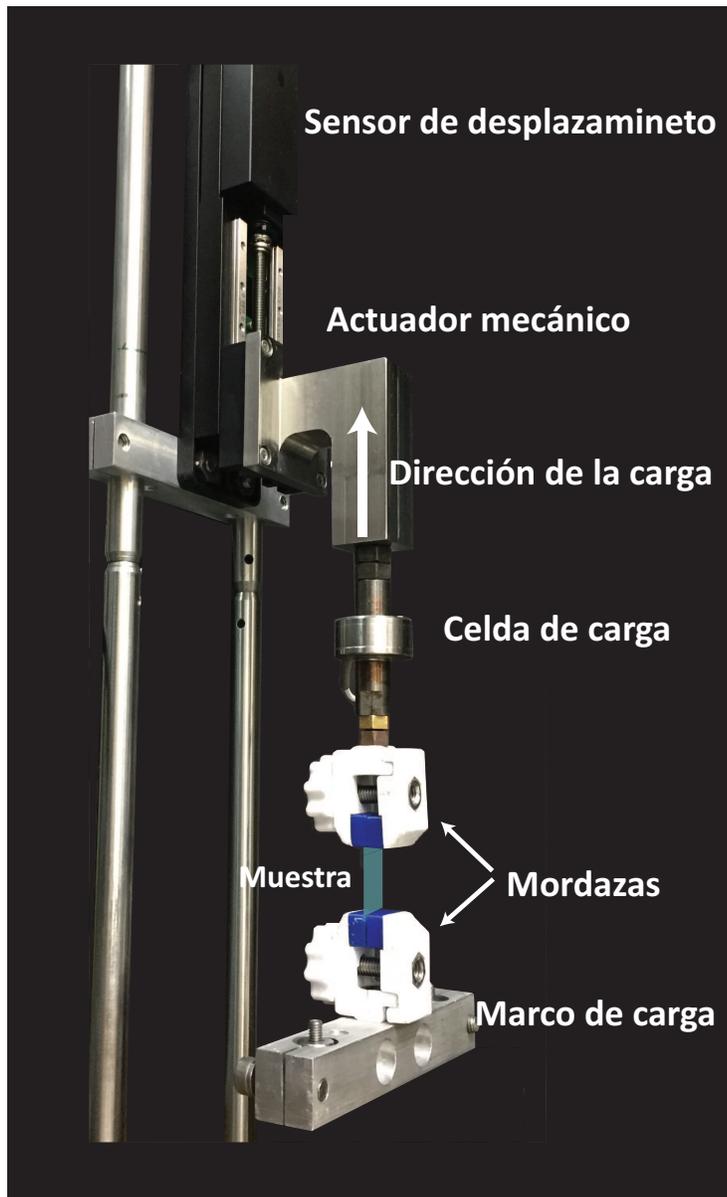


FIGURA 2.5: *Probador de tracción uniaxial diseñado y elaborado en el laboratorio de Mecánica y Micro-mecánica de Sólidos.*

2.4.2. Tracción Biaxial

Teniendo en cuenta que los materiales desarrollados en este trabajo están previstos para ser utilizados como sustitutos o cubiertas cutáneas, es poco probable que únicamente se encuentren expuestos a esfuerzos uniaxiales. Por lo tanto, con el fin de obtener un campo de esfuerzos más realista, se llevaron a cabo ensayos de tracción biaxial por indentación esférica.

Los ensayos de tracción biaxial se realizaron por triplicado a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y con las membranas previamente hidratadas en agua desionizada hasta el equilibrio. Estos ensayos mecánicos por indentación se realizaron acorde al protocolo descrito por Garnica-Palafox *et al.* [73]. Para esta prueba se utilizaron membranas cuadradas de 60 milímetros por lado, los espesores se midieron utilizando un micrometro MDC-1-SXF de la marca Mitutoyo. Dichas membranas se sujetaron firmemente entre placas porta muestras al marco del probador biaxial con un diámetro de 50 *mm*, procurando evitar cualquier pliegue o algún daño superficial en la RPSI montada. Posteriormente, las membranas fueron indentadas hasta los 6.5 *mm* con un indentador esférico de 5 *mm* de radio a una velocidad controlada de 0.16 *mm/s*, a temperatura ambiente. Los datos de fuerza y desplazamiento adquiridos se guardaron para su futuro análisis. Por último, para determinar el módulo elástico, los datos experimentales se ajustaron al modelo reportado por Garnica Palafox *et al.* [73].

$$\frac{6w}{EhR} = \frac{27\pi}{8} \left(\frac{a}{R}\right)^{\frac{9}{4}} \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 \quad (2.4)$$

Donde h es el espesor de la membrana, R el radio del indentador, a el radio del sujetador, w la carga central aplicada, δ corresponde al desplazamiento central, y E es el módulo elástico (ver figura 2.6). Por lo tanto, basándonos en la ecuación 2.4 y las características del probador ($a/R = 5$); el módulo elástico se determinó como la pendiente de la sección lineal de la curva carga-deflexión $6w$ vs $0.376 (\delta/R)^3 hR$.

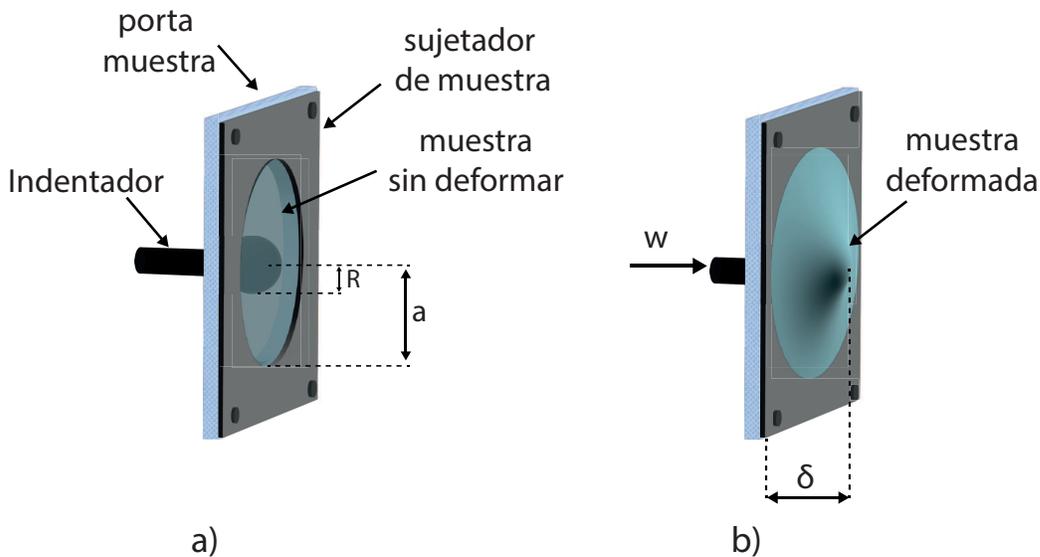


FIGURA 2.6: Diagrama del principio de funcionamiento del probador de tracción biaxial diseñado y fabricado en el laboratorio de Mecánica y Micro-mecánica de Sólidos. a) Muestra previa a ser deformada, b) Muestra deformada tras su indentación.

2.4.3. Microindentación

Las pruebas de microindentación se realizaron con el fin de entender el comportamiento mecánico de las RPSI a nivel micrométrico y compararlo con su comportamiento a un nivel macrométrico. La microindentación se realizó con el equipo Femto Tools FT-MTA 02 con una punta de indentación FT-S200 (punta de vidrio esférica de $50 \mu\text{m}$ de diámetro) con un rango de

medición de $\pm 200 \mu\text{N}$ y una resolución máxima de $0.0005 \mu\text{N}$. Las mediciones se realizaron por triplicado en las membranas de $200 \mu\text{m}$ de espesor bajo condiciones de cultivo, es decir, después de ser hidratadas con medio de cultivo durante 48 horas, con una velocidad de indentación $10 \mu\text{m/s}$, con una frecuencia de muestreo de 20-50 Hz, un paso de indentación de $0.1 \mu\text{m}$, una fuerza máxima de $125 \mu\text{N}$ y una distancia de indentación máxima de $70 \mu\text{m}$. De los datos adquiridos, se obtuvieron curvas de fuerza-desplazamiento para cada RPSI. Posteriormente, los datos experimentales se ajustaron a dos modelos diferentes con el propósito de determinar cuál modelo ajusta mejor a los datos experimentales y bajo qué condiciones se puede utilizar uno o el otro para los materiales desarrollados. Los dos modelos propuestos para indentación fueron; el modelo de Hertz [109] (ecuación 2.5) y el modelo de Ogden [109] (ecuación 2.6). Por último, se procedió a ajustar los modelos mediante la técnica de mínimos cuadrados no lineales utilizando el *software* “Mathematica”.

$$F = \frac{4ER^{\frac{1}{2}}\delta^{\frac{3}{2}}}{3(1-\nu^2)} \quad (2.5)$$

$$F = \frac{40Ea^2}{9\alpha(1-\nu^2)} \left[\left(1 - 0.2\frac{a}{R}\right)^{-\frac{\alpha}{2}-1} - \left(1 - 0.2\frac{a}{R}\right)^{\alpha-1} \right] \quad (2.6)$$

Donde F es la fuerza ejercida por el indentador, R es el radio del indentador, δ es la distancia de indentación (ver figura 2.7), E el módulo elástico, ν la relación de Poisson ($\nu = 0.5$ para materiales elastoméricos) y a está definido como el radio de contacto el cual varía respecto a δ como $a = R^{1/2}\delta^{1/2}$. Obteniendo así módulo elástico para cada material.

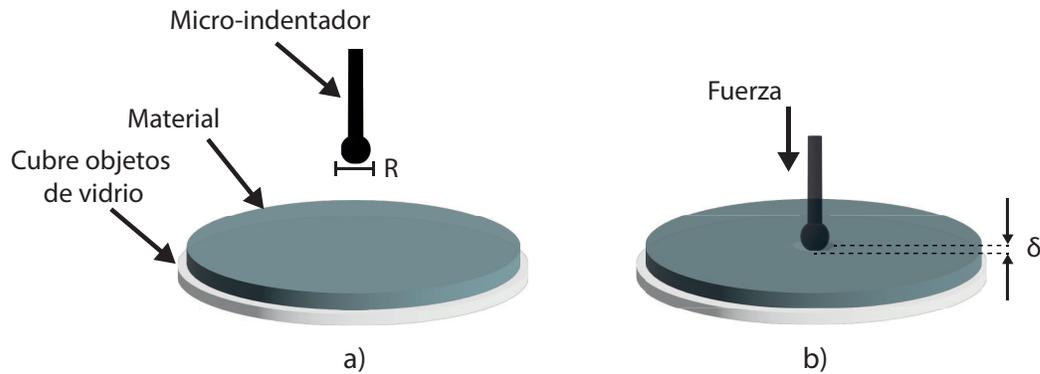


FIGURA 2.7: Diagrama representativo del funcionamiento del micro-indentador. a) Muestra sin deformar, b) Muestra deformada por el micro-indentador.

2.5. Caracterización biológica

La citocompatibilidad es una característica importante que los materiales deben cumplir para su aplicación en contacto con tejidos vivos. Por tanto, es necesario realizar pruebas biológicas *in vitro* para evaluar la interacción de cada uno de los materiales con los fibroblastos, célula clave en el proceso de cicatrización. Estas pruebas proporcionarán información acerca de la capacidad del material para promover una respuesta celular favorable. En esta sección se describen los detalles de las técnicas utilizadas para la evaluación de la respuesta de las células al ser sembrados sobre las diferentes RPSIs. De igual manera, se presenta a detalle el proceso realizado para el cultivo *in vitro* de los fibroblastos, así como el conteo celular y análisis morfológico. Cabe destacar que todas las pruebas biológicas se realizaron en colaboración con el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT).

2.5.1. Cultivo celular

Para el cultivo celular, se utilizaron fibroblastos de prepucio neonatal humano inmortalizados etiquetados como línea celular BJ (ATTC CLR-2522). Estas células fueron descongeladas colocándolas dentro de crioviales en agua a 37 °C durante 2 minutos. Una vez descongeladas, se transfirieron a tubos Falcon de 15 mL con 3 mL de medio de cultivo alto en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM) previamente atemperado a 37 °C y se centrifugaron a 1200 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 5 mL más de DMEM. Luego, las células fueron disgregadas mediante pipeteo y transferidas a cajas Petri. Finalmente, las células en las cajas Petri se mantuvieron con DMEM alto en glucosa suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), GlutaMAX 1X y antibiótico/antimicótico 1X a 37 °C y 5 % de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días hasta alcanzar la confluencia. Cabe destacar que todos los agentes utilizados se compraron en Gibco de Thermo Fisher Scientific y se utilizaron tal como se recibieron.

2.5.2. Preparación de las muestras para ensayos *in vitro* de viabilidad celular y citotoxicidad

Para el sembrado de los fibroblastos sobre las RPSIs, se fabricaron membranas circulares de 17 mm de diámetro y 200 μ m de espesor, siguiendo el procedimiento previamente descrito para la fabricación de membranas. Sin embargo, para las pruebas biológicas, se optó por depositar el material sobre cubreobjetos circulares y así obtener el cubreobjeto recubierto con las respectivas RPSIs. Esta decisión se basó en la necesidad de minimizar posibles

variaciones en la adhesión y la proliferación de los fibroblastos en las diferentes RPSIs, ya que algunas de ellas presentaban una mayor propensión a la flotación, lo que ocasiona una mala adhesión de los fibroblastos. Una vez que los cubreobjetos se recubrieron con las diferentes RPSIs, se colocaron en una placa de cultivo de 12 pozos para llevar a cabo los procedimientos de lavado e funcionalización con fibronectina.

Primero se realizaron 5 lavados con 1 mL de etanol al 70 % (volumen/volumen) previamente filtrado con un filtro de 0.22 μm , y cinco veces con disolución estéril 1X de buffer fosfato salina de Dulbecco (DPBS, por su siglas en inglés). Posteriormente, cada pozo se incubó con 1 mL de fibronectina a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante diez minutos. Con el fin de promover la adhesión celular. Después de este tiempo, el exceso de fibronectina se retiró y se enjuagó con agua desionizada previamente filtrada con un filtro de 0.22 μm . Luego, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar durante cuarenta minutos. Finalmente, se sellaron y almacenaron toda la noche a 4 °C hasta el sembrado de células.

2.5.3. Formación de constructos

Una vez que las células cultivadas alcanzaron la confluencia, se desprendieron de las cajas de Petri realizando los siguientes pasos: En primer lugar, se realizó un enjuague con 2 mL de tripsina al 0.25 %. Luego, las células se incubaron con 2 mL de tripsina al 0.25 % durante tres minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactivó la tripsina colocando medio de cultivo DMEM de alta glucosa adicionado con suero fetal bovino 10 %, GlutaMAX 1X y antibiótico/antimicótico 1X. Una vez que las células se suspendieron, se sembraron

aproximadamente 5×10^4 células por pozo sobre la superficie de las RPSIs y sobre cubreobjetos tratados con fibronectina al igual que las RPSIs. Los cubreobjetos de vidrio se consideraron como material control para las pruebas de citotoxicidad y viabilidad celular. Los cultivos se mantuvieron en incubación durante 48 horas bajo condiciones estándar de cultivo celular *in vitro* (i.e 37 °C y 5% de CO₂).

2.5.4. Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad *in vitro*

La prueba de viabilidad celular se analizó a través de un ensayo vivo/muerto utilizando calceína-AM/ yoduro de propidio. Con esta prueba se determinaron a la par las células vivas y las células muertas mediante la emisión de fluorescencia.

Cabe resaltar que la calceína-AM al ser metabolizada exclusivamente en células vivas, tiñe a toda la célula emitiendo fluorescencia en color verde aproximadamente a los 515 nm al excitarse a 490 nm, por otro lado el yoduro de propidio logra penetrar la célula y teñir el núcleo en aquellas que su membrana celular está dañada, emitiendo de esta manera una fluorescencia en color rojo alrededor de los 617 nm al ser excitada con una frecuencia de 533 nm; lo cual indica que las células teñidas de rojo están muertas. De esta forma, la detección de la señal de calceína sin la presencia de la señal de yoduro de propidio indica la viabilidad celular.

Una vez que se cumplieron las 48 horas de cultivo, se aspiró el medio de cultivo y se realizó un enjuague con medio de ayuno² (DMEM alto en glucosa adicionado con GlutaMAX 1X y Antibiotico/Antimicótico 1X) a cada una

²Entiendase medio de ayuno, al medio de cultivo sin el suero fetal bovino.

de las RPSIs y al material control. Posteriormente, se incubaron con 1 μM de calceína-AM y 5 μM de yoduro de propidio en 1 mL de medio de ayuno durante 15 minutos a 37 °C. Después de este tiempo, se aspiró completamente el medio y se sustituyó por 1 mL de medio de ayuno. A continuación, se adquirieron cinco imágenes de diferentes zonas por cada una de las muestras con un microscopio de epifluorescencia marca Thunder utilizando un lente objetivo 10X. Las micrografías obtenidas se guardaron para su futuro análisis estimando la viabilidad celular mediante la siguiente ecuación.

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \left(\frac{células\ vivas}{células\ vivas + células\ muertas} \right) \times 100\% \quad (2.7)$$

2.5.5. Conteo celular y análisis morfológico

El conteo de las células y su análisis morfológico se realizó mediante el procesamiento de las micrografías tomadas en la prueba de viabilidad celular; estas imágenes se analizaron con el *software* CellProfiler (Broad Institute) [110–113]. Este *software* es de acceso libre y es ampliamente utilizado para la cuantificación de imágenes biológicas; en este programa se generó una secuencia de pasos, llamados “*pipeline*”. Esta serie de pasos constó de los siguientes comandos: filtro a escala de grises, identificación y conteo de objetos primarios, identificación de objetos secundarios, medición de parámetros morfológicos (i.e diámetro de Feret³ y excentricidad⁴) y, por último, la ge-

³El diámetro de Feret corresponde a la distancia entre dos líneas paralelas entre sí, tangentes a los bordes que definen la geometría irregular del objeto.

⁴Cociente entre la distancia del foco de una elipse al centro y la longitud del semieje mayor. Este factor es indicativo del grado de alargamiento de una partícula.

neración de los archivos con la información de dichos parámetros (ver figura 2.8).

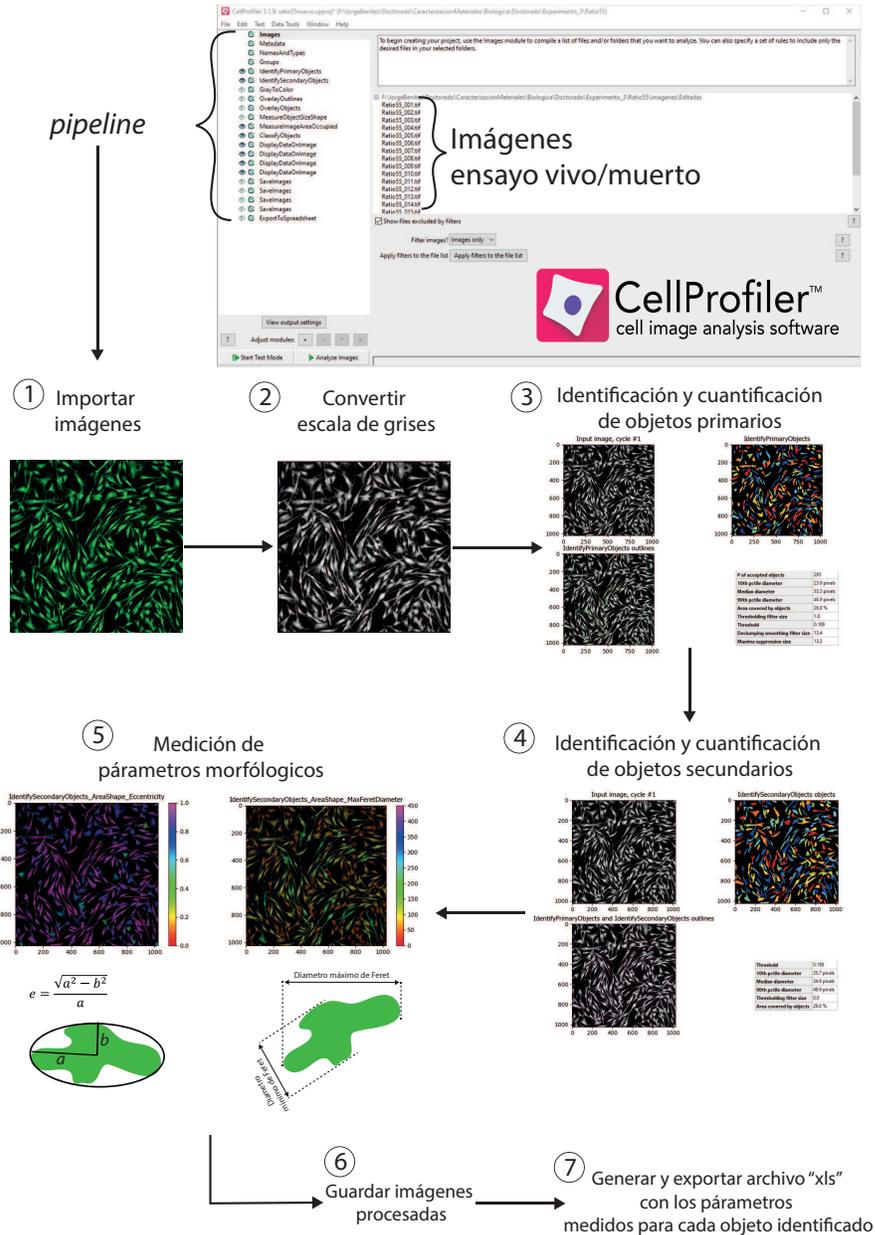


FIGURA 2.8: Captura de pantalla de la interfaz de usuario del software "CellProfiler", y la secuencia de pasos utilizada para determinar el diámetro de Feret y la excentricidad.

Capítulo 3

Resultados

En este capítulo se presentarán y discutirán los resultados obtenidos durante la caracterización fisicoquímica, mecánica y biológica de las redes poliméricas semi-interpenetradas.

En la figura 3.1 se muestran las gráficas de los módulos de almacenamiento (G')¹ y de pérdida (G'')² con respecto al tiempo para cada uno de los materiales desarrollados. La línea punteada representa el tiempo al cual se presenta el punto de gelificación, es decir, punto en el que el módulo de almacenamiento empieza a ser mayor que el módulo de pérdida.

¹Representa una medida indirecta de la elasticidad del material.

²Representa una medida indirecta de la viscosidad del material.

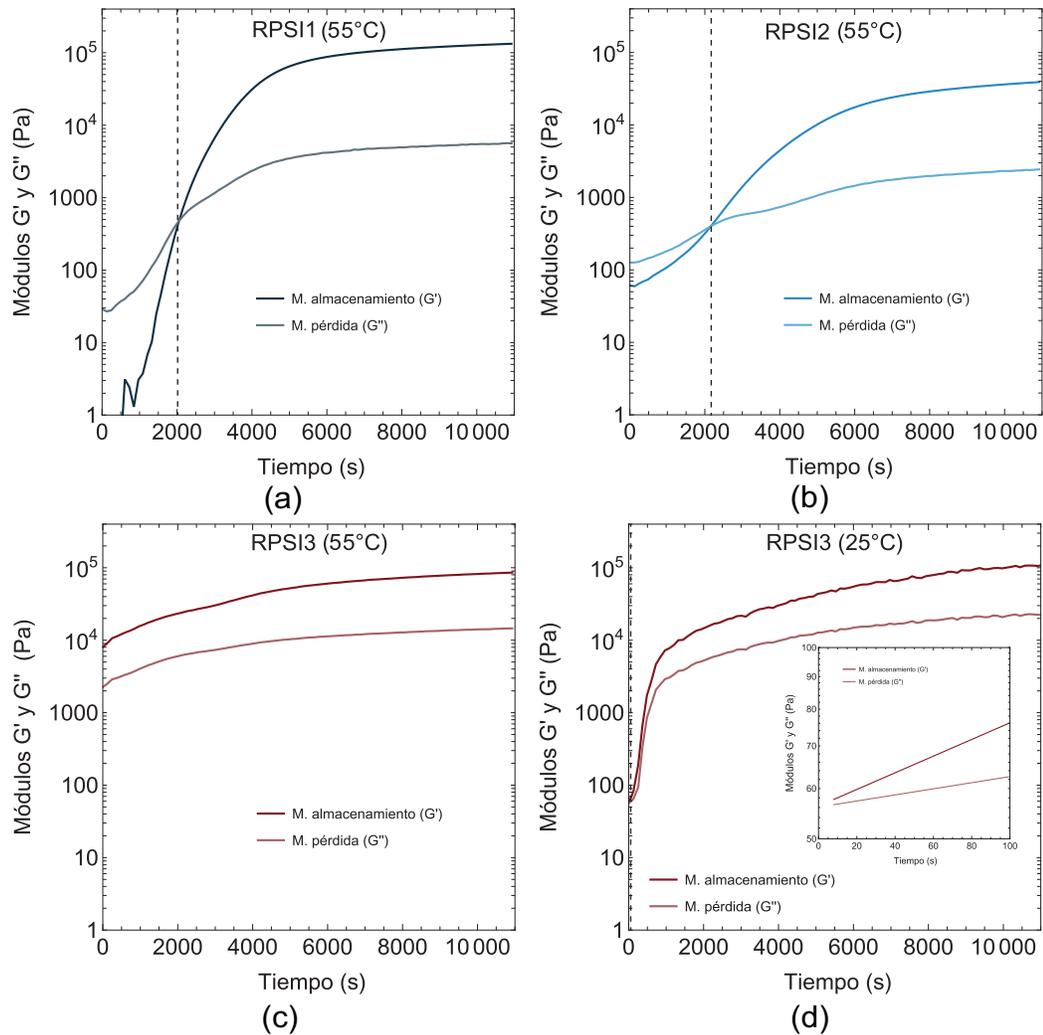


FIGURA 3.1: Gráficas de los módulos de almacenamiento y pérdida obtenidos mediante pruebas reológicas para determinar el punto de gelificación; a) RPSI1 a 55 °C, b) RPSI2 a 55 °C, c) RPSI3 a 55 °C, d) RPSI3 a 25 °C

La figura 3.1 a) muestra que el punto de gelificación se presenta a los 2000 segundos (33.33 minutos) en la RPSI1; mientras que en la figura 3.1 b) se observa que, para la RPSI2 el punto de gelificación se presenta a los 2250 segundos (37.5 minutos) para una temperatura de 55 °C. Como se puede

apreciar en la figura 3.1 c). En la RPSI3 el punto de gelificación no se observa a los 55 °C debido a que la mezcla comenzó a gelificar antes de empezar la medición; por tal motivo, se cambiaron las condiciones de temperatura para determinar el punto de gelificación de dicha mezcla. En esta prueba se utilizó una temperatura de 25 °C; estos resultados se muestran en la figura 3.1 d). Como se puede apreciar en esta figura, el punto de gelificación a temperatura ambiente se observa en los primeros minutos de la prueba. De esta manera, se lograron definir los tiempos de gelificación de cada una de las mezclas, así como los tiempos de manipulación para cada una de ellas. Para la RPSI1 y RPSI2 este tiempo crítico es de aproximadamente 30 minutos para conseguir un esparcimiento uniforme del material aún cuando la mezcla ya se encuentre a 55 °C. Sin embargo, para la RPSI3 el vaciado y esparcimiento del material debe hacerse dentro de los primeros cinco minutos a temperatura ambiente (25 °C).

Una vez determinados estos tiempos, las mezclas se vaciaron y se esparcieron en todo el molde para ser curadas, como se describe en la sección anterior. De esta manera, fue posible obtener redes poliméricas semi-interpenetradas (RPSIs), utilizando tres diferentes proporciones de PDMS y de CS/PVA/GEN, tal y como se describe en tabla 2.1. Considerando la definición de redes poliméricas semi-interpenetradas que se encuentra reportada en la literatura [114–116], es claro que los materiales desarrollados en esta investigación cumplen perfectamente dicha definición. Ya que consta de la integración de dos polímeros que están entrecruzados consigo mismos (PDMS y CS/GEN) y un polímero lineal (PVA) tal como se muestra en la figura 3.2.

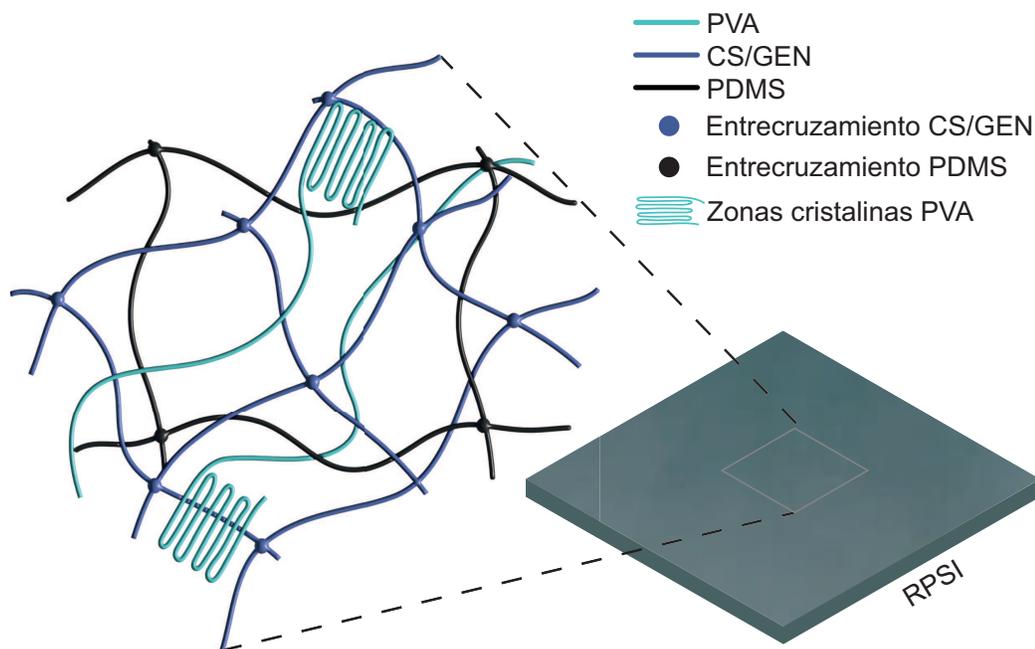


FIGURA 3.2: Diagrama representativo del arreglo de los diferentes polímeros en la formación de redes poliméricas semi-interpenetradas.

Dichas RPSIs se obtuvieron en forma de membrana cuadrada de 60 mm por lado con espesores de 453 ± 80 , 376 ± 52 y $250 \pm 30 \mu\text{m}$, para la RPSI1, RPSI2, RPSI3, respectivamente (figura 3.3a). Encontramos un cambio de volumen después de evaporar los solventes: un 25 % en la RPSI2 y un 50 % en la RPSI3, en comparación con la RPSI1 que tuvo un cambio del 10 %. Lo cual podría deberse a la evaporación de solventes. Por lo tanto, tanto la RPSI2 como la RPSI3 resultaron en membranas más delgadas, incluso al utilizar la misma cantidad de disolución para su fabricación (4 ml por molde).

A primera instancia y realizando una inspección con un microscopio óptico, las membranas muestran un color azul blanquecino -ver esquina inferior izquierda de las figuras 3.3 b), 3.3 c), y 3.3 d)-. Este color azul, se debe principalmente a la reacción de entrecruzamiento entre el genipin y la ami-

na primaria del CS, al estar en contacto con el oxígeno [79, 117]. De igual manera, el color blanquecino es atribuido a la presencia del PDMS en la red polimérica semi-interpenetrada. Es importante mencionar que todas las membranas fueron revisadas de manera cautelosa previo a su uso en las diferentes técnicas de caracterización. Lo anterior, con el fin de descartar defectos como burbujas de aire o cambios de espesor, entre otros.

3.1. Topografía de la superficie de las RPSIs

Mediante la microscopia de fuerza atómica nos fue posible obtener la rugosidad media cuadrática (RMS) S_q para cada una de las RPSIs. En las figuras 3.3 b)-d) se presentan imágenes representativas de la superficie de cada RPSI.

Los resultados obtenidos de rugosidad S_q fueron 5.20 ± 0.51 , 4.77 ± 0.25 , y 10.62 ± 0.12 nm para la RPSI1, la RPSI2, y la RPSI3, respectivamente como se puede ver en la figura 3.3 a). Los valores promedio de S_q de las RPSIs concuerdan con el rango reportado de valores de rugosidad para el PDMS puro que es de aproximadamente 4 nm [118–120] y para la mezcla CS/PVA/GEN de aproximadamente 11 nm [82]. Adicionalmente, los resultados de rugosidad obtenidos sugieren que la rugosidad de las RPSIs se mantiene al incrementar la cantidad de CS/PVA/GEN hasta una proporción volumétrica 1:1 con respecto al PDMS. Caso contrario sucede cuando la cantidad de CS/PVA/GEN es mayor a la cantidad de PDMS presente en la RPSI, como se observa en la figura 3.3 d). Este comportamiento podría deberse a la formación de estructuras fibrilares, las cuales están asociadas al doblamiento de las cadenas poliméricas del PVA [82].

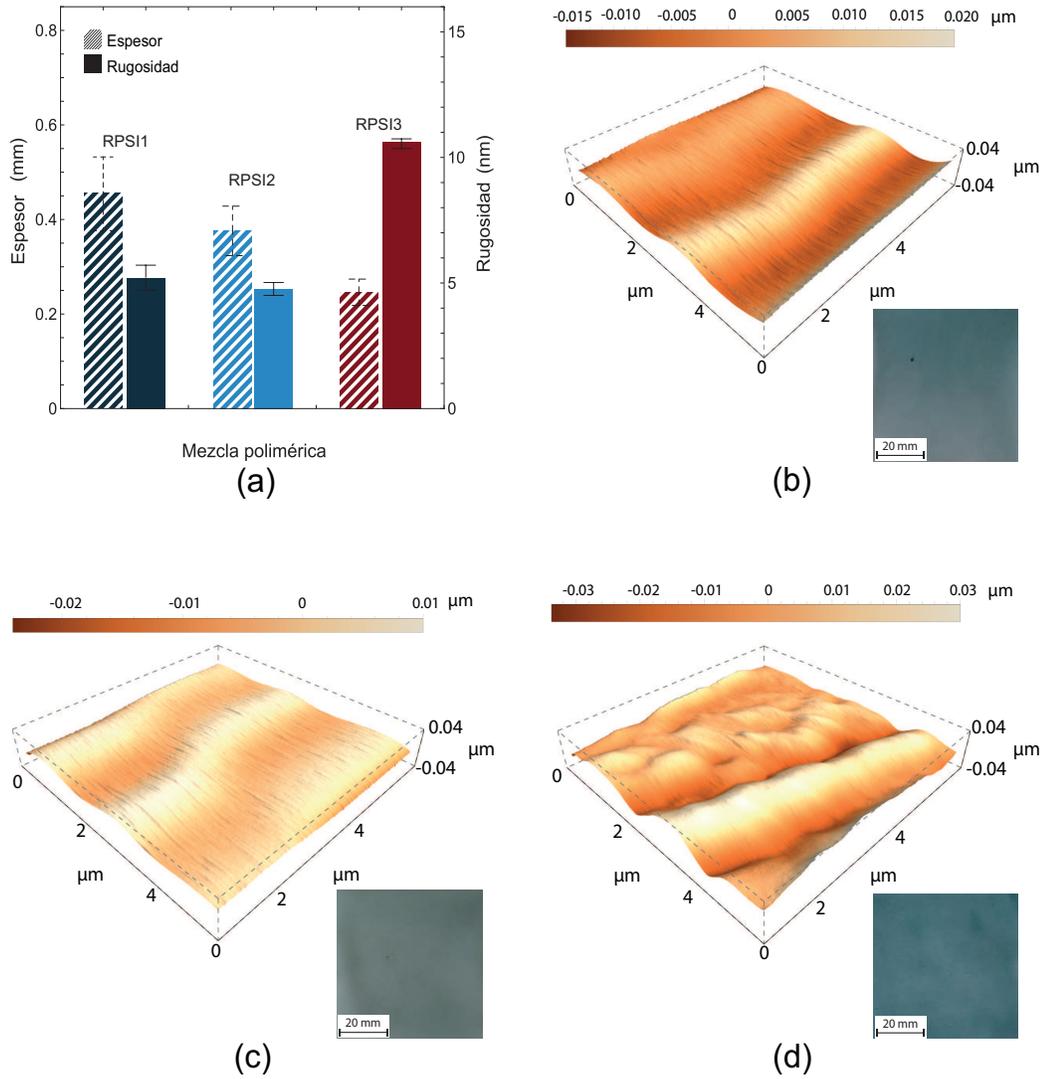


FIGURA 3.3: a) Valores promedio de rugosidad y espesor, con su respectiva desviación estándar. Imágenes de la topografía de las RPSIs adquiridas mediante AFM. En la esquina inferior derecha de cada figura se muestran las membranas obtenidas: b) RPSI1; c) RPSI2 y d) RPSI3. Los datos mostrados son los datos más representativos de tres experimentos independientes.

Cabe resaltar que la rugosidad de las RPSIs juega un rol importante en la adhesión y proliferación celular [121]. Estudios previos han reportado que una rugosidad menor afecta de manera positiva la adhesión y proliferación de células como los fibroblastos de piel humana para estructuras de silicio [122], hidrogeles de colágeno-quitosano [123], plantillas de poliestireno [124], osteoblastos humanos en aleaciones de titanio [125] y en hidrogeles de gelatina y colágeno [126], siempre y cuando la rugosidad se obtenga de manera aleatoria es decir, sin algún patrón establecido de rugosidad.

3.2. Hidrofilicidad de superficie y volumen

La figura 3.4 a) muestra los resultados obtenidos del ángulo de contacto de cada una de las RPSIs, previamente hidratadas durante dieciséis días (tiempo en el cual se alcanza el equilibrio), al estar en contacto con una gota de agua desionizada. Estos valores fueron 67.7 ± 2.1 , 66.5 ± 2.07 , y 65.3 ± 2.36 grados, para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente. Observe, que todas las RPSI presentan ángulos de contacto entre 55° y 75° , que de acuerdo con Gupta *et al.* [127] y Garnica-Palafox *et al.* [82], este rango es favorable para la adhesión de fibroblastos humanos. Como se puede notar, no hay un cambio significativo en el valor promedio de los ángulos de contacto al comparar cada una de las RPSIs.

La figura 3.4 b) muestra la cinética de hinchamiento en porcentaje de agua desionizada de las RPSIs. Como se puede observar en la gráfica, durante el primer día las RPSIs absorbieron 3.08 ± 0.33 , 5.92 ± 0.2 , y $11.01 \pm 0.62\%$, para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente. Posteriormente, el hinchamiento se llevó a cabo de manera lenta hasta los 16 días. El porcentaje de

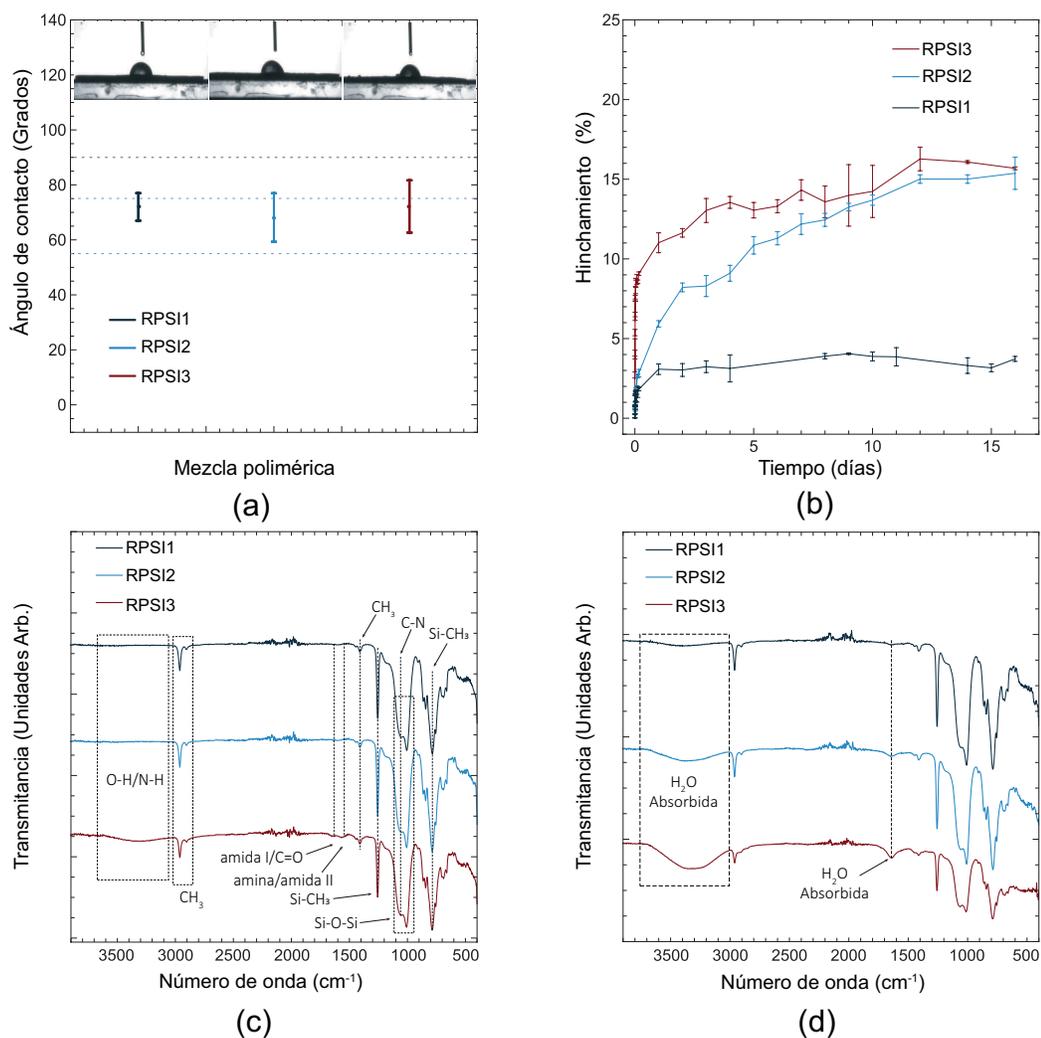


FIGURA 3.4: *Hidrofilicidad de superficie y volumen de las RPSIs. a) valores promedio y desviación estándar del ángulo de contacto de cada una de las RPSIs, b) promedio y desviación estándar de la cinética de hinchamiento para cada RPSI, c) espectro de FT-IR representativo en condiciones secas para cada RPSI; d) espectro de FT-IR representativo en condiciones de hidratación hasta el equilibrio para cada RPSI.*

hinchamiento al equilibrio fue: 3.72 ± 0.15 , 15.28 ± 0.25 , y $15.69 \pm 0.087\%$ para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente. Así pues, se puede notar que la RPSI1 presenta menor capacidad de hinchamiento. Esto debido a que tiene mayor cantidad de PDMS en la red y de acuerdo con la literatura, la capacidad de absorción de agua de este polímero es menor al 1 % [128].

Además, los resultados muestran que la mezcla CS/PVA/GEN, con un porcentaje de hinchamiento del 200 %, mejora aproximadamente 4 veces la capacidad de absorción de agua del PDMS puro, cuyo porcentaje de hinchamiento en agua es inferior al 1 % [128]. Al comparar la RPSI2 y la RPSI3 con la RPSI1, se observa un aumento en la capacidad de hinchamiento incrementó 4.1 y 4.2 veces, respectivamente.

3.3. Interacción química entre las redes poliméricas

Las figuras 3.4 c) y 3.4 d) muestran los espectros FT-IR de las RPSIs en condiciones secas e hidratadas, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que, al incrementar la proporción de CS/PVA/GEN después de una relación de 1:1 (m/m), el porcentaje de transmitancia de la banda a 3700-3000 cm^{-1} disminuye; esta banda está relacionada con las vibraciones de estiramiento de los grupos N-H/O-H pertenecientes al CS y PVA [2, 73, 82, 129], presentes en la mezcla CS/PVA/GEN. Asimismo, están relacionadas con los puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares presentes en la interacción entre el CS y el PVA [130, 131]. La banda entre los 2960 y 2900 cm^{-1} , corresponde a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de los grupos metilo (C-H_3) presentes en el PDMS. Adicionalmente, entre

2930 y 2900 cm^{-1} , se localizaron las vibraciones del enlace C-H presentes en el CS y el PVA [129, 132]. Entre los 1680 y 1600 cm^{-1} se detectaron las vibraciones de estiramiento del enlace C=O, las cuales pertenecen a las unidades acetiladas del quitosano. De igual manera, entre los 1600 y 1500 cm^{-1} , se observan las vibraciones por flexión del enlace N-H y las vibraciones por estiramiento del enlace C-N, pertenecientes a los grupos amina y amida tipo II del quitosano. Como consecuencia de la reacción de entrecruzamiento del CS con el GEN por la apertura del anillo dihidropirano, se detectó una banda a los 1380 cm^{-1} [82]. La banda entre los 1257 y 785 cm^{-1} , está asociada con los enlaces Si-CH₃ del PDMS [133]. Por último, la banda observada entre los 1100 y 1000 cm^{-1} , corresponde a las vibraciones de estiramiento de los enlaces Si-O, y Si-O-Si, debido a la presencia del PDMS en todas las RPSIs [133]. En la figura 3.4 d), se pueden observar los espectros FT-IR de las RPSIs después de 16 días de hinchamiento (i.e. al estado de equilibrio). Aquí se puede visualizar un decremento significativo en la transmitancia de las bandas a 3700-3000 cm^{-1} y 1650-1600 cm^{-1} . Dicho decremento se debe principalmente a la afinidad con el agua de los grupos N-H/O-H presentes en el CS y el PVA [7, 131, 134]. Este comportamiento concuerda con los resultados presentados en la cinética de hinchamiento y demuestra que la presencia de los grupos hidroxilo y grupos amino en la mezcla CS/PVA/GEN incrementa la hidrofiliidad de volumen de las RPSIs.

3.4. Estabilidad térmica y cristalinidad

En las figuras 3.5 a)-c) se muestran los termogramas de pérdida de masa en función de la temperatura para cada una de las RPSIs y sus respecti-

vos termogramas diferenciales (DTG), los cuales se obtuvieron mediante la primera derivada del porcentaje de pérdida de masa con respecto a la temperatura; para propósitos de una mejor visualización y localización de las temperaturas se presentan de forma positiva. Los DTG indicaron que la degradación de la RPSI1 y la RPSI2 ocurrió en tres principales etapas.

En un intervalo de 25 a 105 °C, se observó una pérdida de masa de alrededor de 0.08 %, debido principalmente a la evaporación de agua, humedad atrapada en la RPSI y/o a la evaporación de solventes como el ácido acético. Posteriormente, en un intervalo entre 105 y 430 °C, se registró la primera degradación; la cual podría deberse principalmente a la deshidratación del anillo sacarido del CS y a la degradación de las unidades acetiladas y desacetiladas [70, 135]. En este rango de temperatura la RPSI1 y la RPSI2, registraron una pérdida de peso de 7.87 ± 0.33 % y 7.99 ± 0.21 %, respectivamente. La segunda etapa de degradación se observó entre 430 y 613 °C para la RPSI1 y entre 430 y 588 °C para la RPSI2. Esta pérdida de masa puede deberse principalmente a la degradación de la cadena principal del PVA [70, 135], así como a la depolimerización del PDMS y la formación de oligómeros cíclicos [136, 137]. Los valores de degradación registrados en esta segunda etapa para la RPSI1 y RPSI2 fueron de 59.43 ± 3.4 % y 54.43 ± 9.36 %, respectivamente. Por último, la tercera etapa de degradación para la RPSI1 se registró entre los 613 y 700 °C , mientras que para la RPSI2 se registró entre los 588 y 700 °C ; esta etapa está asociada a la depolimerización del PDMS y a la formación de oligómeros cíclicos [136, 137].

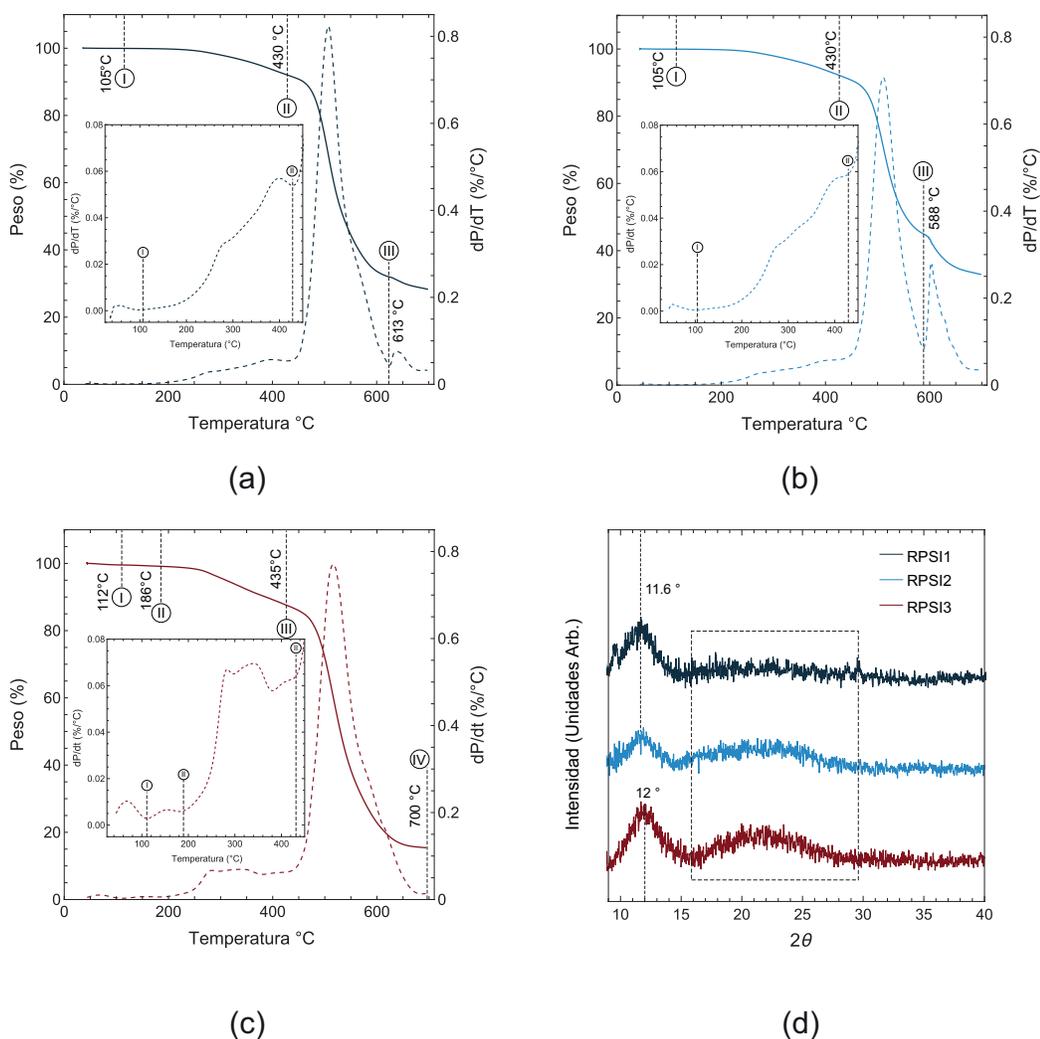


FIGURA 3.5: Comportamiento térmico y cristalinidad de las RPSIs. a) Curvas de estabilidad térmica de las RPSI1 obtenida mediante TGA, b) Curvas de estabilidad térmica de las RPSI2 obtenida mediante TGA, c) Curvas de estabilidad térmica de las RPSI3 obtenida mediante TGA, d) espectro de rayos-X para cada una de las RPSI. Los valores mostrados son los datos más representativos de tres experimentos independientes.

Por otro lado, el DTG de la RPSI3 indicó cuatro regiones donde existe una pérdida de masa. En un intervalo de 25 a 112 °C, se observó una disminución de masa de alrededor del 0.52 %, debido principalmente a la evaporación

de agua, humedad atrapada en la RPSI y/o a la evaporación de solventes como el ácido acético. Posteriormente, en un intervalo entre 112 y 186 °C, se observó una pérdida de aproximadamente 0.35 %; la cual se podría deber al agua estructural [138, 139]. La tercera región está asociada a la degradación del material, la cual se llevó a cabo entre 186 y 435 °C. Esta etapa se puede atribuirse principalmente a la deshidratación del anillo sacarido del CS y a la degradación de las unidades acetiladas y desacetiladas [70, 135]. Aquí se registró una pérdida de masa de 14.01 ± 3.02 %. La última etapa de degradación se observó entre 435 y 700 °C, donde se tuvo una pérdida de masa de 60.62 ± 10.8 %. Esta degradación podría deberse a la degradación de la cadena principal del PVA [70, 135], a la depolimerización del PDMS y la formación de oligómeros cíclicos [136, 137]. A los 700 °C, se obtuvieron residuos de 28.39 ± 2.37 %, 30.49 ± 5.93 % y 24.49 ± 8.27 % para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente. En la tabla 3.1 se resumen los intervalos de temperatura, con sus respectivos porcentajes de pérdida de masa para cada RPSI.

TABLA 3.1: *Porcentaje de masa perdida en cada intervalo de temperaturas para cada una de las RPSIs.*

RPSI1		RPSI2		RPSI3	
<i>Intervalo</i>	<i>Masa</i>	<i>Intervalo</i>	<i>Masa</i>	<i>Intervalo</i>	<i>Masa</i>
<i>de temp. (°C)</i>	<i>perdida (%)</i>	<i>de temp. (°C)</i>	<i>perdida (%)</i>	<i>de temp. (°C)</i>	<i>perdida (%)</i>
25-105	0.07 ± 0.03	25-105	0.08 ± 0.01	25-112	0.52 ± 0.05
105-430	7.87 ± 0.33	105-430	7.99 ± 0.21	112-186	0.35 ± 0.04
430-613	59.43 ± 3.4	430-588	54.13 ± 9.36	186-435	14.01 ± 3.02
613-700	4.24 ± 1.74	588-700	7.30 ± 4.35	435-700	60.62 ± 10.80
Residuos	28.39 ± 2.37	Residuos	30.49 ± 5.93	Residuos	24.49 ± 8.27

De acuerdo con la literatura, tanto el PDMS, como el CS y el PVA presentan por separado fases semi-cristalinas. En la figura 3.5 b), se presentan los difractogramas obtenidos para cada una de las RPSIs. Como se puede observar, se identificó un pico, lo que nos indica que las RPSIs presentan un estado semi-cristalino. Para las RPSI1 y RPSI2, este pico se visualiza a los 11.6 grados; el cual podría corresponder a la fase tetragonal de la celda unitaria de la fase cristalina del PDMS [140–144]. Para la RPSI3 se observó el pico a los 12 grados, el cual podría deberse al plano cristalino (100) de la fase cristalina del PVA [2, 145]. Adicionalmente, entre $2\theta = 17$ y $2\theta = 28$ se observa un incremento de intensidad la cual podría deberse a la contribución del quitosano y del PVA en la red polimérica semi-interpenetrada. Cabe resaltar que la intensidad del difractograma del PDMS oculta los picos del CS y PVA.

El porcentaje de cristalinidad para las RPSI fueron; $37 \pm 4\%$, $51 \pm 3\%$, y $59 \pm 3\%$ para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente. Comparando las semi-cristalinidades de la RPSI2 y la RPSI3 con respecto a la RPSI1, se observó un incremento de 1.45 y 1.51 veces más respectivamente. Como se mencionó anteriormente, el PVA tiende a formar estructuras fibrilares por el doblamiento de sus cadenas poliméricas, lo cual conlleva a un incremento en la rugosidad del material. Por lo tanto, a una mayor cantidad de PVA presente en la RPSI, mayor será su cristalinidad y, por consecuencia, su rugosidad superficial aumentará.

TABLA 3.2: *Porcentaje de cristalinidad para cada una de las RPSIs.*

Mezcla polimérica	Cristalinidad (%)
RPSI1	38 ± 8
RPSI2	56 ± 4
RPSI3	58 ± 1

3.5. Comportamiento mecánico

3.5.1. Tracción uniaxial y biaxial

Los resultados obtenidos de la caracterización mecánica mediante las técnicas de tracción uniaxial y tracción biaxial por indentación esférica se presentan en la figura 3.6. Es importante destacar que, en ella se muestran las curvas representativas de cada RPSI y, tanto los valores promedio, como la desviación estándar se obtuvieron a partir de los ensayos por triplicado de cada material.

Una vez que las membranas se hidrataron hasta el equilibrio (dieciséis días), se realizó el ensayo de tracción uniaxial. En la figura 3.6 a) se presentan las curvas de esfuerzo *vs.* razón de elongación representativas para el PDMS y para cada una de las RPSIs. Como se puede observar, estos materiales presentan un comportamiento mecánico no lineal, el cual puede estar atribuido principalmente al reacomodo de las cadenas poliméricas durante el ensayo de tracción uniaxial. Es decir, éstas pasan de un acomodo aleatorio a un acomodo ordenado. Lo anterior implica que las cadenas tenderán a alinearse en la dirección en la que se aplica la carga. En este sentido, el PDMS

puro presentó una razón de elongación de 1.77 ± 0.03 y un esfuerzo de tracción último (UTS) de 1.14 ± 0.2 MPa. Por su lado, la RPSI1 presentó una razón de elongación de 2.22 ± 0.14 y un esfuerzo de tracción último (UTS) de 1.98 ± 0.38 MPa. Mientras que la RPSI2 presentó una razón de elongación de 2.03 ± 0.22 y un UTS de 0.69 ± 0.19 MPa. Finalmente, la razón de elongación y el UTS obtenidos para la RPSI3 fue de 1.27 ± 0.07 y un UTS de 0.23 ± 0.06 MPa.

En las curvas presentadas, se puede notar cómo la combinación de PDMS con CS/PVA/GEN mejora la capacidad de deformación de las RPSIs Tomando en cuenta la razón de elongación máxima del PDMS puro es de 1.77 ± 0.03 , se observa que la RPSI1 aumentó 1.25 veces esta propiedad, mientras que para la RPSI2 el incremento fue de 1.15 veces. Esto podría atribuirse a la presencia del PVA en la RPSI, ya que al no estar entrecruzado químicamente, este polímero posee una mayor capacidad de desdoblamiento y movimiento de las cadenas poliméricas. Por último, se observa que para el caso de la RPSI3, la razón de elongación disminuye aproximadamente a un valor cercano al del hidrogel híbrido CS/PVA/GEN reportado por Garnica-Palafox *et al.* 2016 [2], que es de 1.16 ± 0.04 .

En comparación con el hidrogel híbrido CS/PVA/GEN, cuyo UTS reportado es de 0.41 ± 0.15 [2], se observó un incremento de 4.83 y de 1.68 veces para la RPSI1 y la RPSI2, respectivamente. Esto podría deberse a la contribución de la red de PDMS en la RPSI, ya que el PDMS al estar en forma de red, la resistencia a la deformación es mayor. Para la RPSI3 se observó una disminución de 1.58 veces en comparación con el hidrogel híbrido en cuanto al UTS. Esto podría deberse a que la red está sufriendo una precarga debi-

da al agua absorbida por la contribución del PVA, por lo tanto se necesita un menor esfuerzo para que esta red semi-interpenetrada llegue al punto de ruptura.

Utilizando los datos experimentales, se calculó el módulo de elasticidad tanto para el PDMS puro como para cada una de las RPSIs mediante un ajuste no lineal, representado por las línea continua, utilizando el modelo de Mooney-Rivlin (ecuación 2.3), previamente descrito en la subsección 2.4.1. Los valores de módulo elástico obtenidos fueron: 1.57 ± 0.17 , 1.59 ± 0.12 , 0.96 ± 0.06 y 1.01 ± 0.18 MPa para el PDMS puro, la RPSI1, la RPSI2, y la RPSI3, respectivamente. Estos resultados son similares con los datos previamente reportados en la literatura para el módulo de elasticidad de la piel en la región del antebrazo que está en un rango de 0.5-1.12 MPa[31–33]. Esta similitud en el módulo elástico es particularmente favorable considerando el contexto de aplicación buscado para las RPSIs.

Para el caso de la caracterización mecánica por tracción biaxial, los datos obtenidos de fuerza y desplazamiento (figura 3.6 b) fueron procesados utilizando la metodología propuesta por Garnica-Palafox *et al.* 2019 [73], previamente descrita en la subsección 2.4.2. Los resultados se muestran figura 3.6 c) como curvas $6w$ vs $0.376 \left(\frac{\delta}{R}\right)^3 hR$. Mediante la pendiente de la sección lineal de estas curvas, se calculó el módulo elástico para cada red polimérica semi-interpenetrada, dando como resultado los siguientes valores: 1.56 ± 0.14 , 1.69 ± 0.07 , 0.86 ± 0.06 , y 0.85 ± 0.17 MPa para el PDMS puro y para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente.

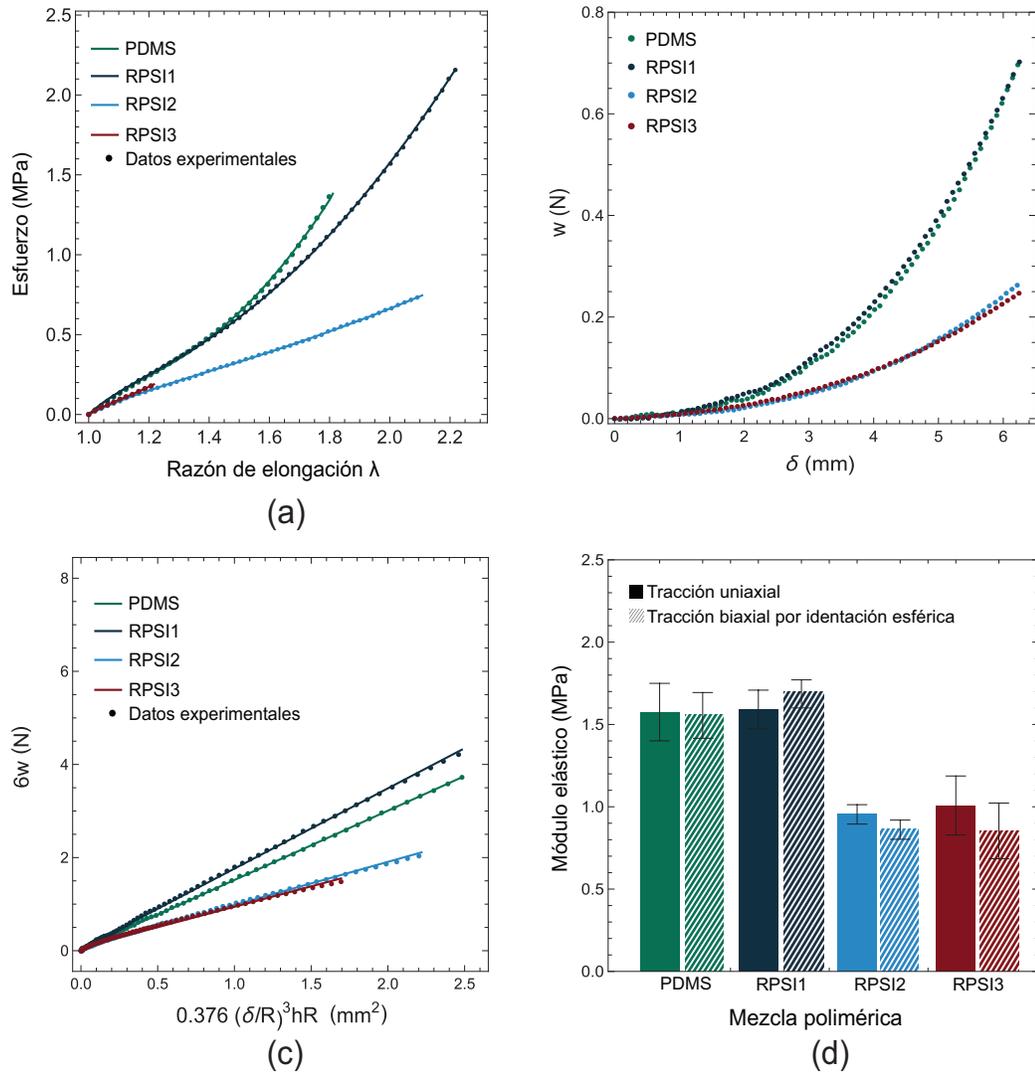


FIGURA 3.6: Comportamiento mecánico de cada una de las RPSIs. a) Curvas experimentales representativas de esfuerzo vs razón de elongación bajo tracción uniaxial y su respectivo ajuste utilizando el modelo de Mooney-Rivlin (líneas continuas), b) curvas experimentales representativas de carga vs deflexión bajo tracción biaxial, c) curvas experimental de carga vs deflexión para tracción biaxial y su respectivo ajuste lineal mediante el modelo de Garnica-Palafox (líneas continuas), d) módulo elástico promedio y desviación estándar obtenido mediante tracción uniaxial y tracción biaxial.

En la figura 3.6 d) se muestra la comparación entre el módulo elástico obtenido por tracción uniaxial (barras de color sólido) y el módulo elástico obtenido por tracción biaxial por indentación esférica (barras con patrón rayado) para cada una de las RPSIs. Comparando el comportamiento mecánico de las RPSIs expuestas a esfuerzos uniaxiales y biaxiales, se puede observar que al modificar la relación de PDMS y CS/PVA/GEN en la RPSIs, el módulo de elasticidad se ve afectado. Tanto la RPSI2 como la RPSI3 mostraron una reducción en el módulo elástico cercana a dos veces en comparación con el PDMS puro. Esto podría atribuirse a la influencia del PDMS en los puntos de entrecruzamiento del hidrogel híbrido CS/PVA/GEN, lo que posiblemente ocasiona un aumento en el tamaño de la red. Este cambio, a su vez, tiene un impacto directo en el módulo de elasticidad de las muestras. Dicho resultado se abordarán con mayor profundidad en la sección de discusión de resultados.

Con el propósito de mejorar la visualización de las propiedades mecánicas mencionadas previamente, en la siguiente tabla se han agrupado los valores promedio de la razón de elongación (λ), el valor promedio del esfuerzo de tracción último (UTS), el módulo elástico promedio obtenido por tracción uniaxial (E_u) y el módulo elástico promedio obtenido por tracción biaxial (E_b).

TABLA 3.3: *Propiedades mecánicas del PDMS, de cada una de las RPSIs y del hidrogel híbrido CS/PVA/GEN.*

	PDMS	RPSI1	RPSI2	RPSI3	CS/PVA/GEN*
λ	1.77± 0.03	2.22± 0.14	2.03± 0.22	1.27± 0.07	1.16± 0.04
UTS (MPa)	1.14± 0.20	1.98± 0.38	0.69± 0.19	0.23± 0.06	0.41± 0.15
E_u (MPa)	1.57± 0.17	1.59± 0.12	0.96± 0.06	1.01± 0.18	2.08± 0.11
E_b (MPa)	1.56± 0.14	1.69± 0.07	0.86± 0.06	0.85± 0.17	1.93± 0.02

* Valores obtenidos de Garnica-Palafox (2019) [92]

3.5.2. Microindentación

En las figuras 3.7 a) y 3.7 b), se muestran las gráficas representativas de fuerza *vs* distancia de indentación para cada una de las RPSIs. Como se puede observar, el comportamiento de estas gráficas es no lineal. Por esa razón se realizó una comparación entre dos modelos Hertz (lineal) y Ogden (no lineal) ver figuras 3.7 a) y 3.7 b). Los puntos de las gráficas representan los datos experimentales, mientras que la línea continua representa el ajuste al modelo de Hertz y al modelo de Ogden. En la figura 3.7 incisos c) y d) se muestran la gráficas promedio y desviación estándar de los residuales para el ajuste de Hertz y Ogden, respectivamente.

De acuerdo con la literatura [109], el modelo de Hertz es aceptable para deformaciones menores a 0.05 (i.e $\epsilon < 0.05$), lo que, según las características del indentador utilizado, corresponde en nuestro caso a una distancia de indentación δ menor a 1.6 μm . Al comparar estas dos figuras, podemos observar que los residuales para el modelo de Hertz, antes de 1.6 μm (línea punteada), son menores a los residuales obtenidos con el modelo de Ogden. Por otro lado, los residuales del modelo de Ogden son menores que los del

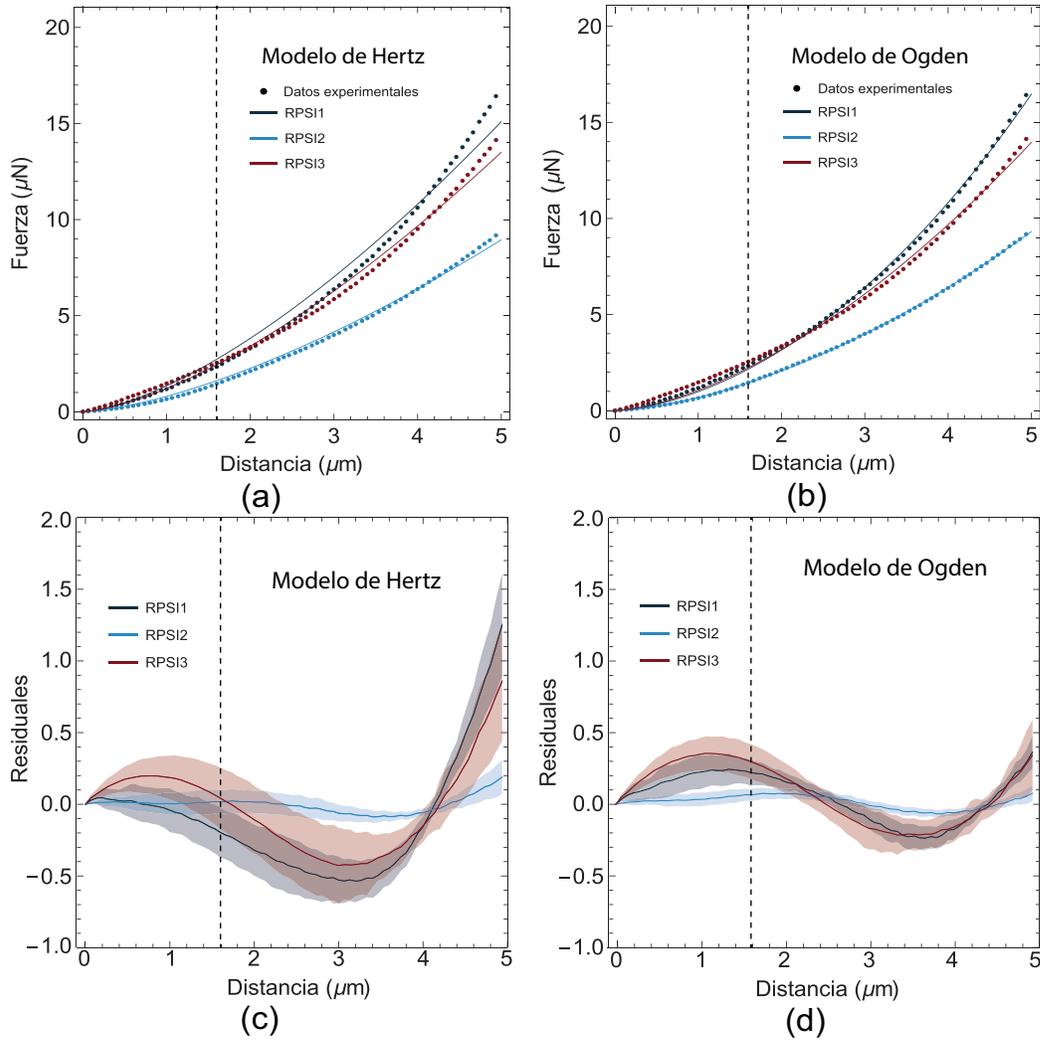


FIGURA 3.7: Caracterización mecánica por microindentación y su respectivo ajuste utilizando el modelo de Hertz a $1.6 \mu\text{m}$ de indentación y el modelo de Ogden para una distancia de $5 \mu\text{m}$. a) curvas experimentales de fuerza vs profundidad de indentación con su respectivo ajuste no-lineal mediante el modelo de Hertz, b) curvas experimental de fuerza vs profundidad de indentación con su respectivo ajuste no-lineal mediante el modelo de Ogden, c) promedio y desviación estándar de los residuales del ajuste mediante el modelo de Hertz, d) promedio y desviación estándar de los residuales del ajuste mediante el modelo de Ogden.

modelo de Hertz para distancias de indentación superiores a $1.6 \mu\text{m}$. Esto sugiere que el modelo de Hertz es adecuado siempre y cuando se utilice para deformaciones pequeñas, mientras que el modelo de Ogden tienen una mayor precisión para las deformaciones mayores, lo que coincide con lo reportado en la literatura [109].

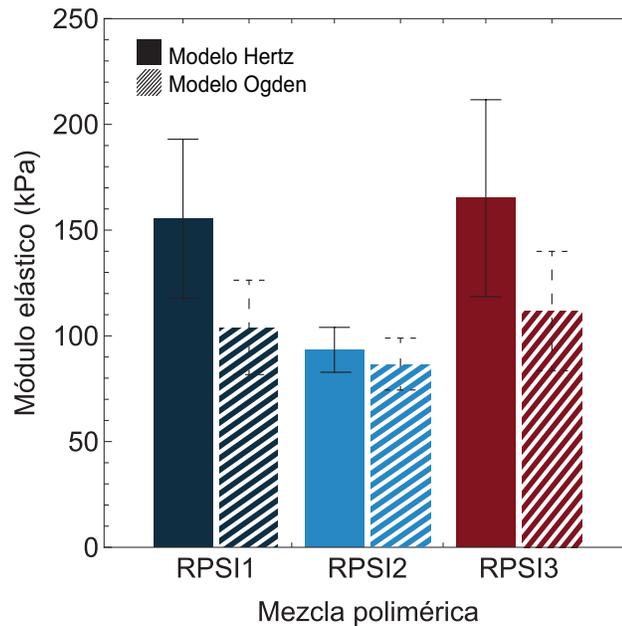


FIGURA 3.8: Comparativa de los módulos elásticos obtenidos de las RPSIs mediante el modelo de Hertz a $1.6 \mu\text{m}$ de indentación y el modelo de Ogden para una distancia de $5 \mu\text{m}$.

A partir del ajuste con cada modelo, se determinó el módulo elástico para cada red polimérica semi-interpenetrada, dando como resultado con el ajuste a modelo de Hertz los valores de: 155.3 ± 37.7 , 93.3 ± 10.7 , y 165.4 ± 46.3 kPa para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente. Mientras que para el ajuste con el modelo de Ogden los módulos elásticos fueron; 103.9 ± 22.4 , 86.4 ± 12.5 , y 111.8 ± 28.1 kPa para la RPSI1, RPSI2, y RPSI3, respectivamente. En la figura 3.8 se muestra una comparativa entre el módulo elástico obtenido

mediante el modelo de Hertz (barras de color sólido) y el obtenido mediante el modelo de Ogden (barras con patrón rayado) de cada una de las RPSIs. Al comparar estos resultados, se puede observar que la precisión del cálculo del módulo elástico de las RPSIs depende tanto del modelo utilizado como de la distancia de indentación. Como se puede apreciar en la gráfica, el error en el módulo elástico debido a la profundidad de penetración es más notorio en la RPSI1 y en la RPSI3. Esto podría deberse a la variación en la proporción de polímeros que componen la RPSI y, al mismo tiempo, al acomodo aleatorio de sus cadenas poliméricas.

3.6. Caracterización biológica

En la figura 3.9 se presentan las micrografías de fluorescencia, para el material control (cubre objetos de vidrio) y cada una de las RPSIs, correspondiente al ensayo de vida/muerte después de 48 horas de cultivo de la línea celular de fibroblastos humanos BJ. Aquí, se pueden apreciar en color verde las células vivas y, en color rojo, el núcleo de las células muertas.

Estos resultados demostraron que la población de células vivas predomina en la superficie de las RPSIs, descartando así algún posible efecto citotóxico de los materiales. Además, al considerar nuestro análisis de imagen, solo se identificaron algunas células muertas en las RPSIs o en el material de control. Cabe resaltar que los puntos rojos que aparecen en la RPSI3 no corresponden a células muertas sino a una fluorescencia del material. Para determinar el porcentaje de viabilidad celular, se comparó la cantidad de células vivas con el número total de células, obteniendo una viabilidad ce-

lular de aproximadamente el 96% para todos los materiales. Es importante destacar que los fibroblastos presentan una forma poligonal y fusiforme en todas las RPSIs, siendo la única diferencia entre ellas el tamaño y número de células. De acuerdo con estudios previos [82, 146, 147], el tener una forma poligonal y fusiforme de los fibroblastos, sugieren que se está llevando una adhesión y proliferación favorables de los fibroblastos sobre las RPSIs.

Con el propósito de cuantificar el número de células adheridas en cada sustrato, se realizó un análisis de conteo de objetos utilizando el *software* CellProfiler. Para esto se utilizaron las imágenes adquiridas mediante microscopía de fluorescencia. Este proceso se realizó por triplicado para cada una de las RPSIs. Además, se evaluó el tamaño de las células adheridas utilizando el diámetro correspondiente a la longitud máxima del eje longitudinal de las células, conocido como diámetro máximo de Feret y la excentricidad de la células. Dado que las células presentaron una forma fusiforme, se realizó un análisis estadístico para identificar los diámetros máximos de Feret y excentricidades más frecuentes. Este procedimiento nos proporcionó datos cuantitativos sobre las características morfológicas de las células adheridas en cada una RPSIs.

Las figuras 3.10 a)-d) muestran los resultados del conteo de las células y la distribución estadística correspondiente al diámetro máximo de Feret. Estos resultados fueron obtenidos a partir del análisis de imágenes realizado después de 48 horas de cultivo celular. En la figura 3.10 a) se observa que las células cultivadas en el material de control exhibieron una distribución del diámetro de Feret centrada en $74.18 \mu\text{m}$, mientras que las RPSI1, RPSI2

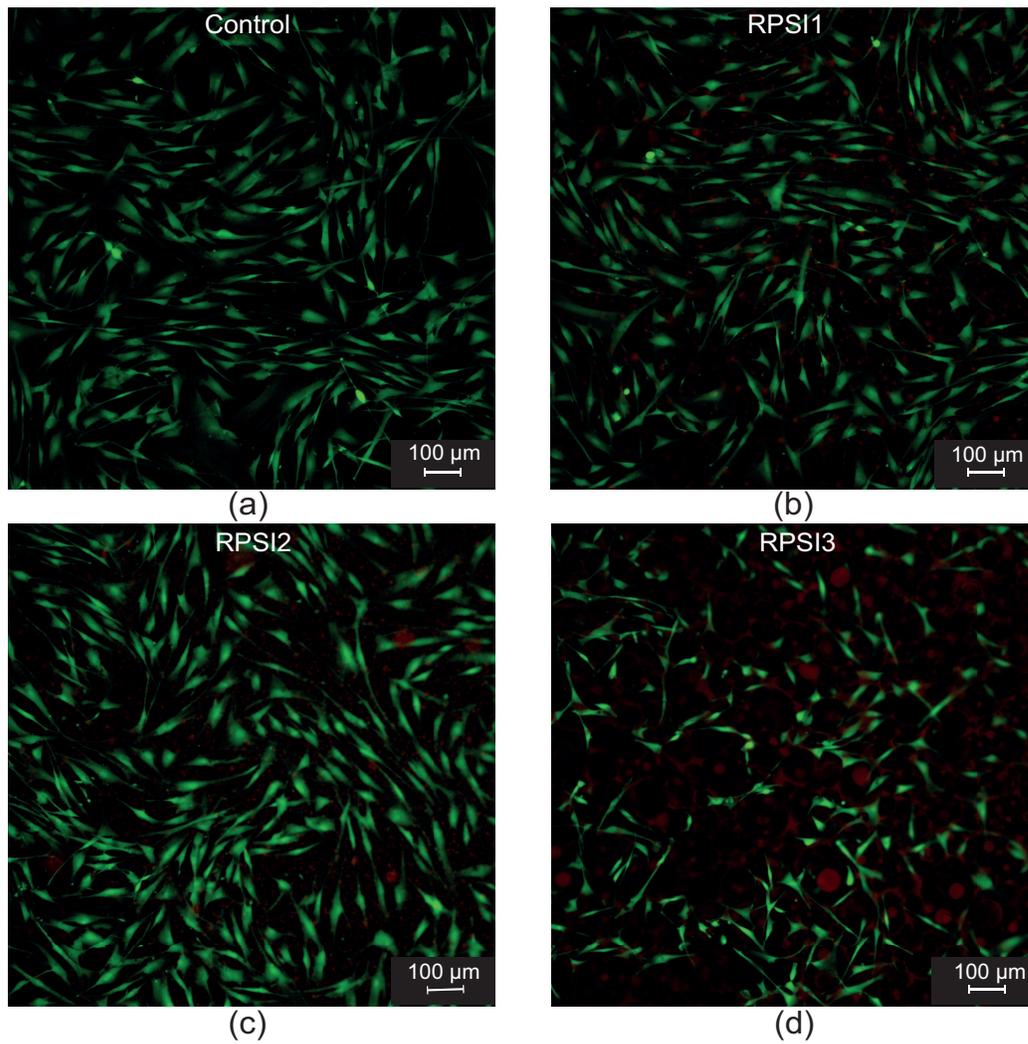


FIGURA 3.9: Respuesta *in vitro* de los fibroblastos BJ sembrados sobre las RPSIs después de 48 horas de cultivo *in vitro*. La marca en color verde en ausencia del color rojo indica las células vivas, y el color rojo indica las células muertas. a) Material control (vidrio), b) RPSI1, c) RPSI2, d) RPSI3.

y RPSI3 mostraron distribuciones del diámetro de Feret centradas en 66.38, 76.1 y 64.61 μm respectivamente (ver figuras 3.10 b-d). De acuerdo con la literatura, el tamaño de los fibroblastos humanos varían entre 10 y 100 micrometros [148]. Por lo tanto, basándonos en este rango, podemos sugerir que nuestras RPSIs ofrecen condiciones adecuadas para la adhesión de este tipo de células. Adicionalmente, de acuerdo con recientes estudios [149–152], el tener células de gran tamaño es indicativo de una mejor capacidad de adhesión, lo cual podría favorecer una mayor producción de colágeno. El cual, es un componente principal en la matriz extracelular y desempeña un papel fundamental en la reparación de heridas cutáneas [153]. Para el caso de la excentricidad, no se observó una diferencia significativa entre las diferentes RPSIs y el material control. Los valores obtenidos fueron 0.90 ± 0.08 , 0.90 ± 0.08 , 0.91 ± 0.07 y 0.90 ± 0.09 para el material control, la RPSI1, la RPSI2 y la RPSI3, respectivamente.

Como se puede observar en las figuras 3.10 a) - 3.10 d), las gráficas de distribución muestran un sesgo positivo; por lo que para obtener una interpretación adecuada del diámetro máximo de Feret, se utilizará la mediana y el rango intercuartílico como medidas de tendencia central y de dispersión. De igual manera, se utilizarán estas dos medidas para la densidad celular con la finalidad de no considerar datos atípicos debidos a un posible error en el procesamiento de las micrografías.

En la figura 3.11 a) se muestra la distribución del diámetro de Feret de las RPSIs, incluyendo sus valores medianos (línea blanca) y el rango intercuartílico (RIQ) representado en barras de color gris. Los valores de las medianas del

diámetro de Feret fueron de 87.9, 82.21, 90.87 y 80.15 μm y sus respectivos valores de RIQ fue 113.08-69.87, 107.04-62.59, 122.14-70.76 y 107.36-61.48 μm para el material control, la RPSI1, la RPSI2 y la RPSI3, respectivamente. Finalmente, la figura 3.11 b) muestra la distribución de densidad celular para el control y cada RPSI. Las líneas en color blanco representan los valores medios de densidad celular. Los valores medios obtenidos para el número de células por milímetro cuadrado fueron; 142.26, 160.41, 162.75 y 109.47 células/ mm^2 y sus respectivos valores de RIQ fue 137.58-160.41, 153.39-173.88, 158.07-172.12 y 102.45-126.46 células/ mm^2 para el material control, la RPSI1, la RPSI2 y la RPSI3, respectivamente.

Tomando como referencia el número de células del material control (cubre objetos de vidrio) se observó que las células adheridas en la RPSI1 y RPSI2 incrementaron en número un 13 y un 14%, respectivamente. Este aumento nos sugiere una mejor adhesión o promoción de la proliferación de las células para con la RPSI1 y RPSI2. Asimismo, en las imágenes de ensayo vivo/ muerto (figura 3.9) se observa que, en las RPSI1 y RPSI2, los fibroblastos cubrieron casi toda la superficie del material, además de tener una forma morfológica más alargada incluso que aquellos sobre el material control. Basándonos en los resultados de la figura 3.11, las RPSI1 y RPSI2 presentaron mejor citocompatibilidad debido a un mayor número celular y extensión, los cuales son indicativos de proliferación y adhesión, así como de una buena función como la producción de matriz extracelular (MEC). Por lo tanto, hasta el momento estos materiales, poseen un gran potencial para ser considerados en su uso como cubiertas dérmicas para la cicatrización de heridas.

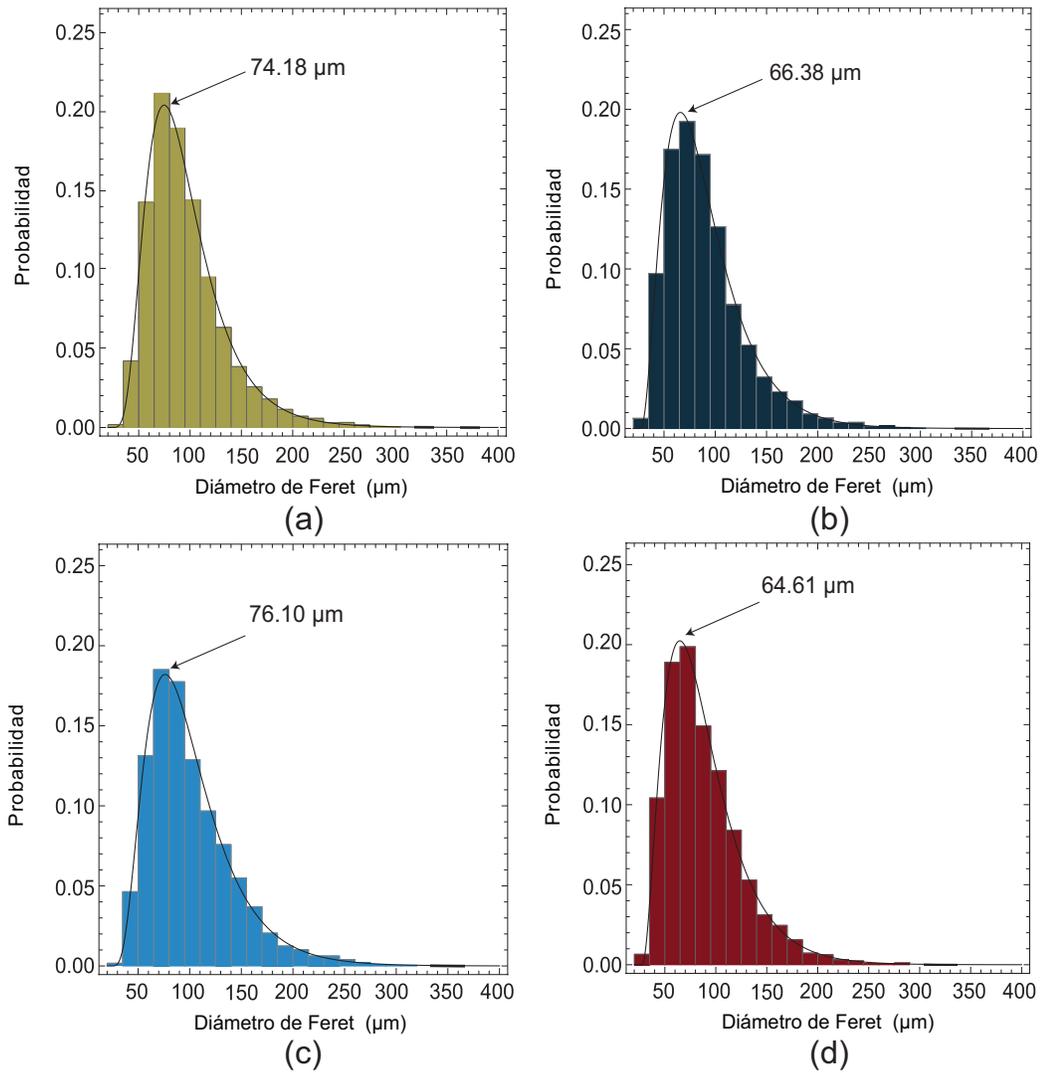


FIGURA 3.10: Distribución estadística del diámetro máximo de Feret para cada RPSI. a) material control, b) RPSI1; c) RPSI2, d) RPSI3. El número indicado con flecha representa el diámetro máximo de Feret con mayor prevalencia.

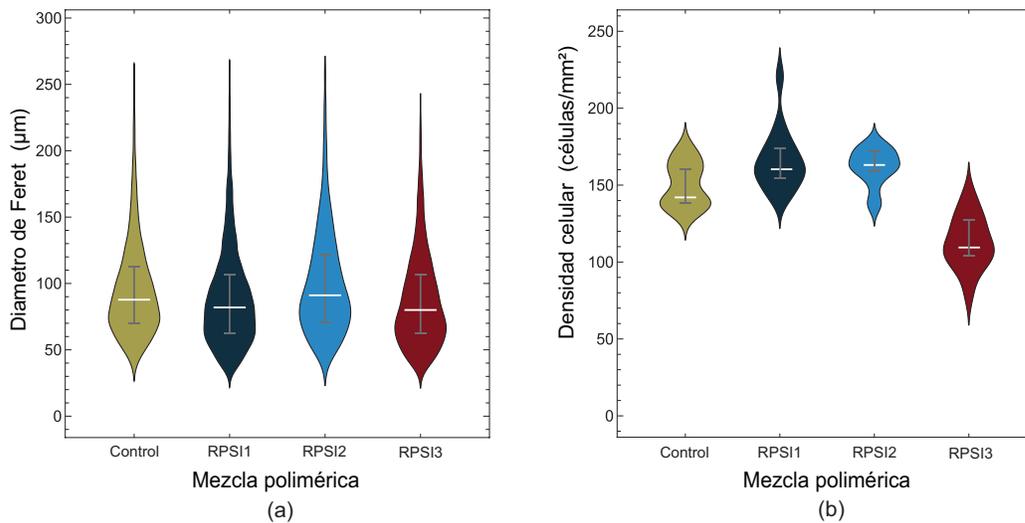


FIGURA 3.11: a) Representación del diámetro máximo de Feret en gráficas de violín para cada una de las RPSIs. La línea central representa la mediana, y las barras en color gris representan el primer y tercer cuartil. b) Representación de la densidad celular en gráficas de violín para cada una de las RPSIs, la línea central representa la mediana, y las barras en color gris representan el primer y tercer cuartil.

3.7. Discusión de resultados

De acuerdo con la literatura, la composición química, la hidrofiliicidad de volumen y superficie, las propiedades mecánicas y la rugosidad de los materiales pueden afectar el comportamiento de las células sembradas sobre la superficie del material [122–124, 154]. Por esta razón, se realizó una comparativa entre la respuesta celular y las propiedades físicas, químicas y mecánicas de cada una de las RPSIs.

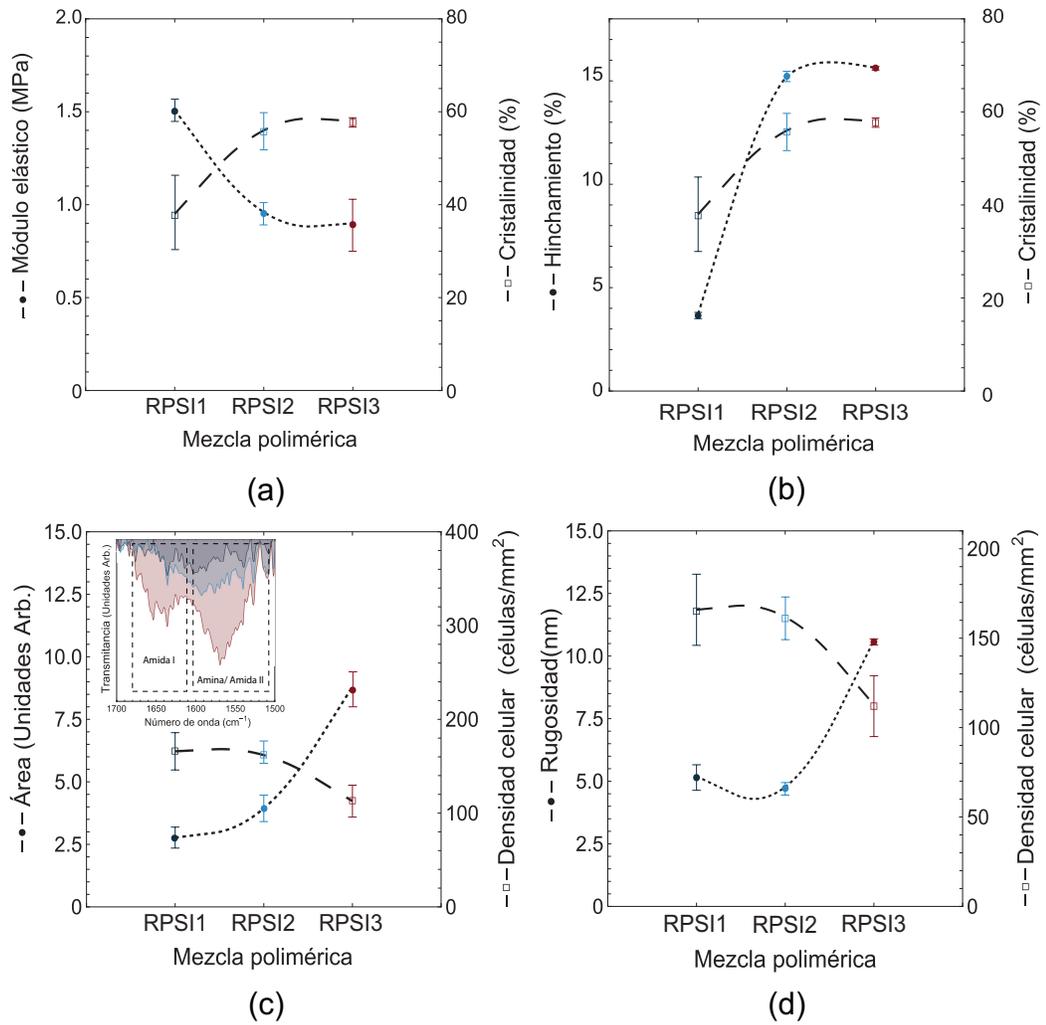


FIGURA 3.12: Correlación de las propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas. a) Módulo de elasticidad y porcentaje de cristalinidad como función de las RPSIs; b) correlación entre la capacidad de hinchamiento y la cristalinidad de las RPSIs; c) correlación de los grupos funcionales del CS con el número de células promedio por milímetro cuadrado; d) relación entre la rugosidad y los valores promedios de la densidad celular.

La figura 3.12 a) expone la relación entre el módulo elástico y el porcentaje de cristalinidad de las RPSIs. Como se puede observar, a medida que aumenta la proporción de CS/PVA/GEN, el módulo elástico disminuye. Lo cual sugiere que la cadena de PDMS puede estar afectando la densidad de puntos de entrecruzamiento de la mezcla CS/PVA/GEN y así verse afectado el módulo de elasticidad. Como se puede observar en la figura 3.12 b) al incrementar la proporción de CS/PVA/GEN en las RPSIs, la cristalinidad aumenta esto debido al plegamiento de las cadenas poliméricas del PVA. Las cuales por sus propiedades hidrofílicas tienen la capacidad de absorber agua. Como se puede ver en la gráfica, a pesar de que los valores de cristalinidad fueron mayores en la RPSI3, su capacidad de hinchamiento resultó similar a la capacidad de la RPSI2. Estos resultados y la gráfica de cambio de volumen (figura 3.13 a)) sugieren que la red polimérica del PDMS podría estar limitando la expansión de la red durante el proceso de hinchamiento y a pesar de tener una mayor capacidad de absorción de agua por una mayor cantidad de PVA presente en la red, ésta se ve limitada por el PDMS que por sí solo no tiene la capacidad de almacenar agua dentro de su red. Para corroborar esto, se utilizaron las teorías de Treloar [101] y de Flory [155], que describen el comportamiento mecánico con base al módulo de corte (G), el peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas (M_c) y el tamaño de poro (D_N) [101]. Utilizando la relación de constantes elásticas y la relación de Poisson de 0.5 para materiales tipo elastómeros, el módulo de corte se determinó como:

$$G = \frac{E}{3} \quad (3.1)$$

Así, de esta manera, se obtuvo el peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento M_c a través de la siguiente ecuación:

$$M_c = \frac{\rho RT}{G} \quad (3.2)$$

Donde R es la constante universal de los gases (8.3145 J/molK), T es la temperatura en Kelvin a la cual fue determinado el módulo de elasticidad (298.15 K); y ρ es la densidad del polímero determinada en estado seco en Kg/m^3 . Dado que el módulo de corte se determinó en estado hidratado, el módulo de corte en estado seco se obtuvo mediante la siguiente relación:

$$G = \frac{G_h}{v^{\frac{1}{3}}} \quad (3.3)$$

Donde G_h es el módulo de corte obtenido mediante la prueba de tracción uniaxial en condiciones de hidratación y v es la fracción volumétrica determinada a través de la ecuación:

$$v = \frac{v_s}{v_h} \quad (3.4)$$

Aquí v_s es el volumen de material en seco y v_h es el volumen del material después de 16 días de hidratación, el cual se calculó midiendo el diámetro y el espesor de los materiales durante las pruebas de hinchamiento. De esta manera una vez calculado el peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento (M_c) se determinó el tamaño de poro con la siguiente ecuación:

$$D_N = \sqrt[3]{\frac{6M_c}{\pi\rho A}} \quad (3.5)$$

Donde A es el número de Avogadro ($6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

En la figura 3.13 a) se muestra el cambio de volumen para cada una de las RPSIs a los diferentes días de hidratación. En esta figura se pueden observar los valores de cambio de volumen, los cuales fueron considerados para hacer el cálculo del tamaño del poro mostrados en la figura 3.13 b).

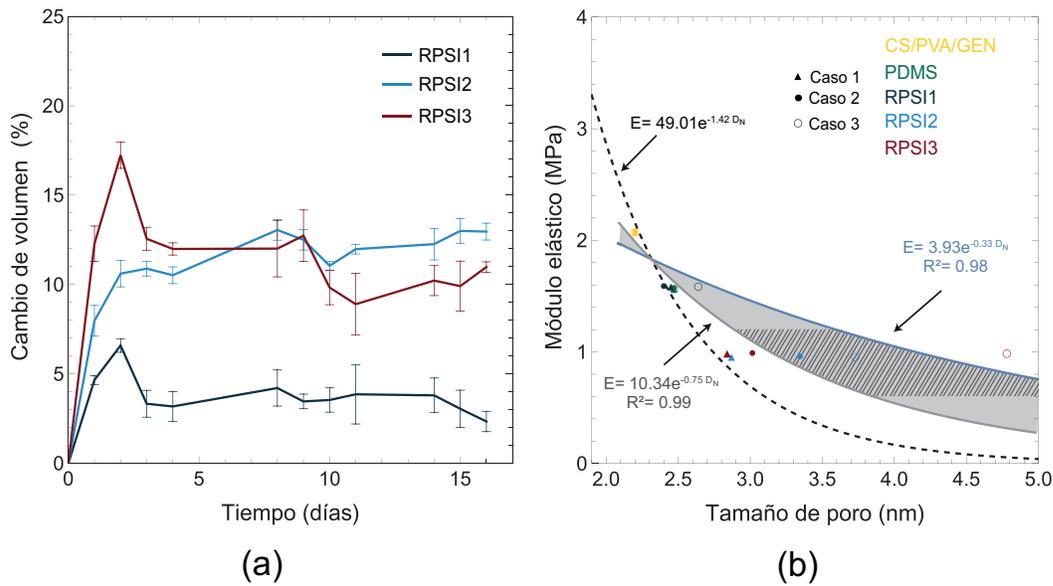


FIGURA 3.13: a) Promedio y desviación estándar del cambio de volumen de cada una de las RPSIs durante la cinética de hinchamiento, b) correlación entre el módulo elástico y el tamaño de poro. El caso uno considera el tamaño de poro como una sola red, el caso dos considera que la única red que se modifica es la red de CS/PVA/GEN y, por último, el caso tres considera que la red que se ve modificada es la del PDMS. La línea en color gris representa el ajuste no lineal para el caso dos, la línea de color azul representa el ajuste no lineal para el caso tres y la línea punteada representa la extrapolación del modelo reportado por Garnica-Palafox et al. 2016 [2]

En esta gráfica se pueden observar tres casos diferentes. El primero de ellos considera que la modificación del tamaño de la red se realizará sobre un todo, es decir, que solo existe una única red entrecruzada. Sin embargo, esto no es del todo correcto, ya que los materiales desarrollados en este trabajo son

considerados como redes poliméricas semi-interpenetradas. Por tal motivo, se realizó una modificación a la ecuación de tamaño de poro previamente descrita (ecuación 3.5).

En esta modificación, se consideró la ley de las mezclas para el tamaño de poro, el cual queda expresado de la siguiente manera (ecuación 3.6):

$$D_N = f_{PDMS}D_{NPMS} + f_{CS}D_{NCS} \quad (3.6)$$

Donde f_{PDMS} y f_{CS} son las fracciones de los componentes, es decir las proporciones del PDMS y del hidrogel híbrido CS/PVA/GEN, respectivamente, en cada una de las RPSIs desarrolladas. El segundo caso, que se muestra en círculos sólidos en la figura 3.13 b), considera que el tamaño de poro de la red de CS/PVA/GEN es el que se modificará por la presencia del PDMS, mientras que el tamaño de poro del PDMS permanece constante. Los valores obtenidos se ajustaron a una curva mediante un ajuste no lineal, el cual está representado mediante la curva color gris e indica el comportamiento del módulo elástico con respecto al tamaño de poro de hidrogel híbrido CS/PVA/GEN. En el tercer caso de análisis, se considera que el tamaño de poro del PDMS se modifica por la presencia del hidrogel CS/PVA/GEN, mientras que el tamaño de poro de este último permanece constante. En este caso, los valores se representan mediante círculos vacíos en la gráfica. De igual manera, estos valores se ajustaron a un modelo no lineal el cual describe el comportamiento del módulo elástico en función del tamaño de poro del PDMS. Este ajuste se muestra mediante la curva en color azul.

Como se puede apreciar en esta gráfica, las RPSIs presentan un tamaño de poro que depende de la composición de la misma. Esta observación podría deberse a tres razones posibles: la red de PDMS podría interferir en los puntos de entrecruzamiento de las cadenas de CS/PVA/GEN, o el CS/PVA/GEN podría interferir en los puntos de entrecruzamiento de las cadenas de PDMS, o quizás sea una combinación de ambas razones. En el análisis anterior, solo se consideraron dos escenarios extremos, es decir, uno u otro. Sin embargo, se espera que el comportamiento más cercano a la realidad, sea una combinación de ambos casos y este comportamiento se encuentre entre los dos modelos calculados, zona representada en la gráfica en color gris sólido. Adicionalmente, se observa que para obtener valores de módulo elástico entre 0.5 y 1.12 MPa (zona representada con patrón diagonal color gris), es necesario obtener tamaños de poro entre 3 y 5 nm. Como se puede apreciar, hasta el momento la única RPSI que cumple con esta condición de tamaño de poro es la RPSI2 compuesta de 5 partes de PDMS y 5 partes del hidrogel híbrido CS/PVA/GEN.

En la figura 3.12 c) se muestra la relación entre la disponibilidad de los grupos funcionales del CS en estado deshidratado y la densidad celular en función de la composición de las RPSI. La disponibilidad de los grupos funcionales del CS se calculó como el área bajo la curva para las bandas 1700-1800 cm^{-1} , correspondientes a los amidas I y aminos/amidas II (ver *inset* figura 3.12 c). La figura 3.12 c) muestra un cambio de los grupos funcionales del CS a medida que aumenta la proporción de CS/PVA/GEN. A pesar de la disponibilidad de amidas I y aminos/amidas II, la densidad celular presenta un comportamiento opuesto, esto puede deberse a la influencia de

otra propiedad de las RPSIs sobre la respuesta biológica como puede ser la rugosidad.

La figura 3.12 d) muestra la relación entre la rugosidad de la superficie y el número de células por milímetro cuadrado en función de la composición del material. Aquí se observa que, a medida que aumenta la proporción de CS/PVA/GEN, la rugosidad también se incrementa; mientras que la densidad celular disminuye. Por lo tanto, una mayor rugosidad superficial aleatoria (i.e. si un patrón predeterminado) de las RPSIs implica una menor adhesión celular en las RPSIs. Estos resultados coinciden con la tendencia reportada en hidrogeles de gelatina-colágeno [126], hidrogeles de colágeno-quitosano [123] y plantillas de poliestireno [124], en los que se menciona que la rugosidad superficial aleatoria de un material puede afectar la adhesión celular y/o al alargamiento de la célula de los fibroblastos. En particular, algunos trabajos [122–124] han reportado que a mayor rugosidad las células adheridas por unidad de área disminuyen. En especial Fiejdasz *et al* 2018 [123] reportó que para valores entre 13 y 45 nm, los fibroblastos humanos cultivados presentan buena viabilidad y adhesión celular. De esta manera, se propone que tanto la RPSI1 como la RPSI2 pueden considerarse materiales potenciales para el desarrollo de cubiertas dérmicas para la cicatrización de heridas. No obstante, aún se requieren realizar más estudios biológicos.

En las figuras 3.14 a) -3.14 d), se ilustran diagramas de las diversas técnicas de caracterización mecánica empleadas para examinar las propiedades de las RPSIs y representan diagramas de las distintas formas en que las cadenas poliméricas podrían deformarse en respuesta a estímulos mecánicos y a diferentes escalas de observación. Así, al someter las RPSIs a tracción uniaxial

y biaxial, se observa que las cadenas de poli(alcohol vinílico) (PVA), representadas en color turquesa, tienden a desplegarse en la dirección de la fuerza aplicada, lo que resulta en una mayor movilidad debido a su falta de entrecruzamiento, lo cual se ve afectado directamente en la razón de elongación. Por otro lado, las cadenas de quitosano/genipin (CS/GEN), en color azul marino, y polidimetilsiloxano (PDMS), en color negro, al estar entrecruzadas, limitan el movimiento y experimentan principalmente deformación de la red, lo cual se ve reflejado en el UTS. A diferencia de estas dos técnicas donde la evaluación de las propiedades mecánicas se realiza sobre todas las cadenas que conforman la RPSI, es decir se tiene una caracterización del material en bulto. En el caso de la micro-indentación, la zona de evaluación se realiza en una zona específica, aproximadamente $5 \mu\text{m}$. Por tal motivo, el módulo de elasticidad es localizado y puede variar principalmente al ordenamiento aleatorio de las cadenas poliméricas.

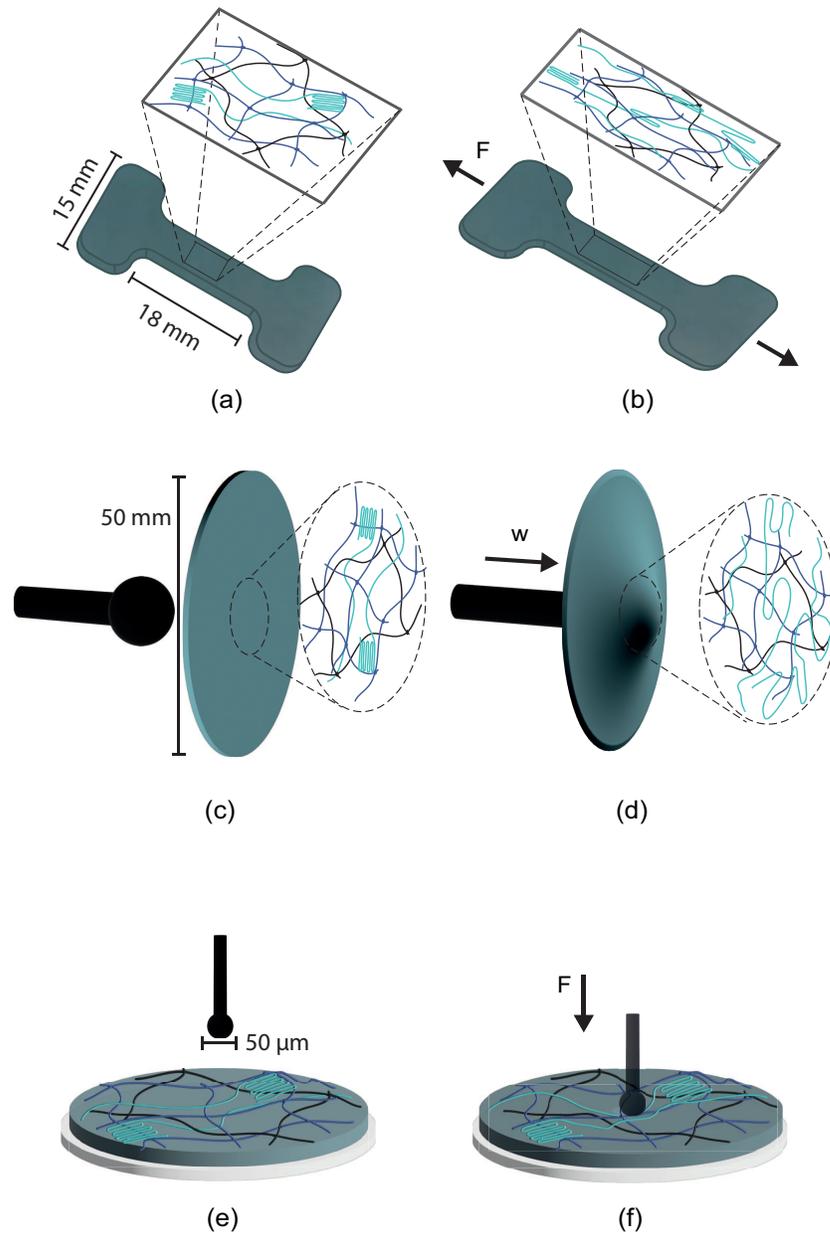


FIGURA 3.14: Diagrama representativo de la deformación de las redes poliméricas al someterse a diferentes estímulos mecánicos. a) arreglo de la RPSI antes de someterse a deformación uniaxial, b) arreglo de la RPSI durante la prueba de tracción uniaxial, c) arreglo de la RPSI antes de ser sometidas a deformación biaxial por indentación, d) arreglo de la RPSI durante la deformación biaxial; e) Arreglo de la RPSI antes de ser sometidas a ensayos de microindentación, f) arreglo de la RPSI durante el ensayo de microindentación.

Conclusiones

La metodología propuesta en este trabajo permitió la síntesis exitosa de las RPSIs en forma de membranas utilizando las tres proporciones másicas propuestas (7:3, 5:5 y 3:7). Mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica se observó que la RPSI con mayor cantidad de CS/PVA/GEN tuvo una mayor rugosidad, atribuida a la formación de estructuras fibrilares asociadas al plegamiento y ordenamiento de las cadenas poliméricas del PVA. Estos resultados se confirmaron mediante la técnica de difracción de rayos-X, los cuales revelaron valores de cristalinidad mayores en las RPSIs con mayor cantidad de CS/PVA/GEN, siendo la proporción 3:7 la que presentó mayor rugosidad y mayor cristalinidad de las tres.

Las pruebas de hinchamiento demostraron que el PVA y el CS/GEN contribuye significativamente a la capacidad de absorción de líquidos de las RPSIs. En comparación con la proporción 7:3, las proporciones 5:5 y 3:7 incrementaron su capacidad de absorción de líquido hasta cuatro veces. Asimismo, las pruebas de hidrofiliidad de superficie mostraron que las RPSIs presentan un ángulo de contacto entre los 55-75°, dicho rango de valores proveen una buena adhesión en los fibroblastos humanos, de acuerdo con lo reportado en la literatura [82, 127].

Los resultados obtenidos a través la espectroscopía FT-IR respaldaron los resultados de las pruebas de hinchamiento de las RPSIs. En todas las proporciones analizadas se observó un aumento en la intensidad de las bandas correspondiente a los grupos N-H/OH y NH₂ libres. Esto implica que una mayor disponibilidad de estos grupos se traduce en una mayor capacidad de absorción de líquidos por parte de los RPSIs. Estos resultados respaldan la utilidad de las RPSIs en aplicaciones que requieren propiedades hidrofílicas y capacidad de absorción de líquidos.

Como se mencionó anteriormente, las RPSIs desarrolladas presentaron un comportamiento mecánico no lineal, el cual depende principalmente al desdoblamiento de las cadenas poliméricas lineales y la interacción entre las dos redes entrecruzadas y el polímero lineal. Además, al modificar la proporción de PDMS y CS/PVA/GEN, también se modifica su capacidad de hinchamiento y, en consecuencia, su respuesta mecánica. Se observó que aumentar la proporción de CS/PVA/GEN resultó en una disminución del módulo elástico en estado hidratado, pasando aproximadamente de 1.6 MPa a 1 MPa. La implementación de pruebas de tracción uniaxial como de tracción biaxial permitió obtener una visión más amplia del comportamiento mecánico de las RPSIs, lo cual resulta fundamental para su aplicación buscada. Estos resultados demuestran que las RPSIs son capaces de emular, en cierta medida, el comportamiento mecánico de la piel humana presente en la zona del antebrazo, cuyo modulo de elasticidad reportado está en el rango de los 0.5-1.12 MPa [31, 32]. Al ajustar las proporciones de los componentes poliméricos, las convierten en candidatas prometedoras para el desarrollo de materiales como cubiertas cutáneas para la regeneración de piel.

Los resultados obtenidos respecto a la respuesta biológica de las RPSIs son altamente alentadores. Después de un período de cultivo *in vitro* de 48 horas, ninguna de las RPSIs demostró tener efectos citotóxicos. Además, los fibroblastos sembrados mostraron morfologías fusiformes y tamaños en un rango de 61.48-122.14 μm , los cuales son similares a los descritos en la literatura de 10-100 μm . Es importante destacar que las RPSIs1 y RPSIs2 (compuestas por 7 partes de PDMS y 3 partes de CS/PVA/GEN, y 5 partes de PDMS y 5 partes de CS/PVA/GEN, respectivamente) exhibieron una mayor densidad de fibroblastos adheridos en su superficie en comparación con la RPSIs3.

Estos resultados son prometedores, ya que indican una excelente biocompatibilidad -reflejada en una viabilidad cercana al 96%-, un posible estado proliferativo y una morfología adecuada de los fibroblastos. Factores importantes para lograr una exitosa regeneración adecuada de piel en heridas cutáneas.

Por lo anterior, estas redes poliméricas semi-interpenetradas muestran un potencial significativo como cubierta cutánea en la regeneración de heridas. Estos resultados nos motivan a continuar con una caracterización biológica más completa y exhaustiva de estas dos RPSIs con el objetivo de ampliar nuestro entendimiento y conocimiento sobre su comportamiento en un entorno biológico y posiblemente regresar a modificar la parte química para así optimizar de mejor manera la respuesta biológica de estos materiales.

Perspectivas y trabajo a futuro

Como trabajo a futuro, se propone llevar a cabo una caracterización biológica más exhaustiva que incluya ensayos como el de adhesión celular en tiempos más cortos y más largos, monitoreando las adhesiones focales y el citoesqueleto de los fibroblastos. El objetivo de este ensayo sería analizar los contactos focales intracelulares y la adhesión al material. Además, se propone realizar ensayos de proliferación celular para comprender con mayor detalle el comportamiento de los fibroblastos en diferentes intervalos de tiempo, como por ejemplo a los 3, 7 y 21 días. De esta manera, se podrá determinar si son capaces de promover la proliferación de las células adheridas a ellos. Como paso adicional, se propone llevar a cabo ensayos de biocompatibilidad en seres vivos como en ratones, con el propósito de determinar si estas RPSIs podrían utilizarse como cubiertas cutáneas para la regeneración de la piel en lesiones como quemaduras o úlceras en pacientes con pie diabético. Estos ensayos permitiría evaluar la biocompatibilidad de las RPSIs al interactuar con tejidos biológicos, evaluando parámetros como tiempo de cierre de la herida y/o nivel de inflamación.

A partir del análisis de las propiedades físicas de las RPSIs se observó que la rugosidad desempeña un papel importante en la densidad celular. Por consiguiente, se plantea realizar modificaciones en la superficie de las RPSIs, específicamente a través de la alteración de su rugosidad mediante técnicas de micro o nano gravado. Se planea llevar a cabo ensayos tanto con fibronectina como sin ella, con el propósito de evaluar el comportamiento celular en relación a la rugosidad y sus efectos en la distribución de esta proteína. Esto permitirá obtener una comprensión más profunda de la interacción entre las células y el material. Esta investigación nos brindará información más precisa sobre cómo las células responden y se adhieren a las RPSIs que presentan diferentes niveles de rugosidad. La investigación resultante nos proporcionará información más precisa acerca de cómo las células reaccionan y se adhieren a las RPSIs que presentan distintos niveles de rugosidad. Al comprender esta interacción de manera más completa, se podrían realizar ajustes y optimizaciones en el diseño de las RPSIs. Esto, a su vez, podría aumentar su eficacia en aplicaciones tales como la regeneración de piel y la ingeniería de tejidos.

Adicionalmente, para lograr una comprensión más completa del arreglo cristalino de las cadenas poliméricas y como complemento al análisis de la cristalinidad realizado a través de la difracción de rayos X, se plantea el uso de otras técnicas, las cuales evalúan la cristalinidad de forma indirecta, como son la espectroscopía por transformada de Fourier y la calorimetría diferencial de barrido.

Apéndice A

Sólidos hiperelásticos y su ecuación constitutiva

Considerando que las redes poliméricas semi-interpenetradas desarrolladas en este trabajo pueden ser modeladas como materiales hiperelásticos, es decir, materiales elásticos cuyo tensor de esfuerzos (\mathbf{S}) puede obtenerse como una función de la energía de deformación (Ψ), los cambios en la temperatura del material, el flujo de calor y la producción local de entropía son despreciados. De modo que, la función de densidad de la energía de deformación depende únicamente de la deformación mecánica aplicada al sistema, y se representa como $\Psi = \Psi(C)$.

En consecuencia, la relación constitutiva que describe los esfuerzos en estos materiales queda determinada por:

$$\mathbf{S} = 2 \frac{\partial \Psi(\mathbf{C})}{\partial \mathbf{C}} = 2 \left(\frac{\partial \Psi_{vol}}{\partial \mathbf{C}} + \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \mathbf{C}} \right) = \mathbf{S}_{vol} + \mathbf{S}_{dev} \quad (\text{A.1})$$

Donde \mathbf{C} es el tensor de deformación de Cauchy-Green por la derecha y está definido como $\mathbf{C} = \mathbf{F}^T \mathbf{F}$, tal que \mathbf{F} es el tensor gradiente de deformación expresado como $\nabla \mathbf{p}$. \mathbf{S}_{vol} es la parte volumétrica y \mathbf{S}_{dev} es la parte desviadora del segundo tensor de Piola-Kirchoff los cuales se expresan de la siguiente manera:

$$\mathbf{S}_{vol} = 2 \frac{\partial \Psi_{vol}}{\partial \mathbf{C}} = 2 \frac{\partial \Psi_{vol}}{\partial J} \frac{\partial J}{\partial \mathbf{C}} = J \frac{\partial \Psi_{vol}}{\partial J} \mathbf{C}^{-1} \quad (\text{A.2})$$

$$\mathbf{S}_{dev} = 2 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \mathbf{C}} = 2 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{\mathbf{C}}} : \frac{\partial \bar{\mathbf{C}}}{\partial \mathbf{C}} \quad (\text{A.3})$$

Donde $\bar{\mathbf{C}} = \bar{\mathbf{F}}^T \bar{\mathbf{F}} = J^{-2/3} \mathbf{C}$, por lo tanto $\frac{\partial \bar{\mathbf{C}}}{\partial \mathbf{C}}$ queda expresada como:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \bar{\mathbf{C}}}{\partial \mathbf{C}} &= \frac{\partial (J^{-2/3} \mathbf{C})}{\partial \mathbf{C}} = -\frac{1}{3} J^{-2/3} \mathbf{C} \otimes \mathbf{C}^{-1} + J^{-2/3} \mathbb{I} \\ &= J^{-2/3} \left(\mathbb{I} - \frac{1}{3} \mathbf{C} \otimes \mathbf{C}^{-1} \right) \end{aligned} \quad (\text{A.4})$$

Utilizando la propiedad de un producto tensorial con una doble contracción $(\mathbf{A} \otimes \mathbf{B}) : \mathbf{C} = \mathbf{A}(\mathbf{B} : \mathbf{C}) = (\mathbf{B} : \mathbf{C})\mathbf{A}$, y recordando que la doble contracción tensorial se puede expresar como $\mathbf{A} : \mathbf{B} = tr(\mathbf{A} \cdot \mathbf{B})$, \mathbf{S}_{dev} se puede escribir como:

$$\mathbf{S}_{dev} = J^{-2/3} \left[\bar{\mathbf{S}} - \frac{1}{3} (\bar{\mathbf{S}} : \mathbf{C}) \mathbf{C}^{-1} \right] \quad (\text{A.5})$$

Donde $\bar{\mathbf{S}} = \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{\mathbf{C}}}$.

Actualmente, existen dos categorías principales de modelos constitutivos

para los materiales hiperelásticos: el modelo micro-mecánico y el fenomenológico.

Los modelos fenomenológicos como el modelo de Mooney-Rivlin [104, 105], Ogden [106] y Yeoh [103] expresan la energía de deformación en términos de la razón de elongación, o bien, de los invariantes del tensor de deformación de Cauchy-Green por la derecha. De tal manera que la energía de deformación queda expresada como:

$$\Psi = \Psi(\bar{I}_1, \bar{I}_2, \bar{I}_3) \quad (\text{A.6})$$

Sustituyendo la expresión A.6 en la ecuación A.3 y utilizando la regla de la cadena se tiene que $\bar{\mathbf{S}}$ se expresa como:

$$\begin{aligned} \bar{\mathbf{S}} &= 2 \frac{\partial \bar{\Psi}(\bar{I}_1, \bar{I}_2, \bar{I}_3)}{\partial \bar{\mathbf{C}}} \\ &= 2 \left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \frac{\partial \bar{I}_1}{\partial \bar{\mathbf{C}}} + \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \frac{\partial \bar{I}_2}{\partial \bar{\mathbf{C}}} + \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_3} \frac{\partial \bar{I}_3}{\partial \bar{\mathbf{C}}} \right) \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

Para $\bar{\mathbf{C}}$ los tres invariantes están dados por:

$$\bar{I}_1(\bar{\mathbf{C}}) = \text{tr}(\bar{\mathbf{C}}), \quad (\text{A.8})$$

$$\bar{I}_2(\bar{\mathbf{C}}) = \frac{1}{2} [\bar{I}_1^2 - \text{tr}(\bar{\mathbf{C}}^2)], \quad (\text{A.9})$$

$$\bar{I}_3(\bar{\mathbf{C}}) = \det(\bar{\mathbf{C}}) = \lambda_1^2 \lambda_2^2 \lambda_3^2 = 1 \quad (\text{A.10})$$

A continuación se desarrollarán las derivadas parciales de los invariantes

1, 2 y 3 con respecto al tensor derecho de Cauchy-Green, utilizando notación indicial en coordenadas cartesianas.

$$\begin{aligned}\frac{\partial \bar{I}_1}{\partial \bar{C}_{ij}} &= \frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} (\bar{C}_{ii} + \bar{C}_{jj} + \bar{C}_{kk}) \\ &= \mathbf{I}\end{aligned}\tag{A.11}$$

$$\begin{aligned}\frac{\partial \bar{I}_2}{\partial \bar{C}_{ij}} &= \frac{1}{2} \left[\frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} (\text{tr}(\bar{\mathbf{C}}))^2 - \frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} \text{tr}(\bar{\mathbf{C}}^2) \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[\frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} (\bar{C}_{11} + \bar{C}_{22} + \bar{C}_{33})^2 \right. \\ &\quad \left. - \frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} (\bar{C}_{11}^2 + \bar{C}_{22}^2 + \bar{C}_{33}^2 + 2\bar{C}_{12}^2 + 2\bar{C}_{13}^2 + 2\bar{C}_{23}^2) \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[2 \frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} (\bar{C}_{11} + \bar{C}_{22} + \bar{C}_{33}) \right. \\ &\quad \left. - 2 \left(\frac{\partial \bar{C}_{11}}{\partial \bar{C}_{ij}} + \frac{\partial \bar{C}_{22}}{\partial \bar{C}_{ij}} + \frac{\partial \bar{C}_{33}}{\partial \bar{C}_{ij}} + 2 \frac{\partial \bar{C}_{12}}{\partial \bar{C}_{ij}} + 2 \frac{\partial \bar{C}_{13}}{\partial \bar{C}_{ij}} + 2 \frac{\partial \bar{C}_{23}}{\partial \bar{C}_{ij}} \right) \right] \\ &= [(\bar{C}_{11} + \bar{C}_{22} + \bar{C}_{33})\mathbf{I} - \bar{C}_{ij}] \\ &= \bar{I}_1 \mathbf{I} - \bar{\mathbf{C}}\end{aligned}\tag{A.12}$$

$$\begin{aligned}\frac{\partial \bar{I}_3}{\partial \bar{C}_{ij}} &= \frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} (\det(\bar{\mathbf{C}})) \\ &= \frac{\partial}{\partial \bar{C}_{ij}} (\bar{C}_{11}\bar{C}_{22}\bar{C}_{33} + 2\bar{C}_{12}\bar{C}_{23}\bar{C}_{31} \\ &\quad - \bar{C}_{11}\bar{C}_{23}^2 - \bar{C}_{22}\bar{C}_{31}^2 - \bar{C}_{33}\bar{C}_{12}^2) \\ &= \bar{I}_3 \bar{\mathbf{C}}^{-1}\end{aligned}\tag{A.13}$$

De tal forma que sustituyendo las ecuaciones A.11, A.12, A.13 en la ecuación A.7, $\bar{\mathbf{S}}$ se puede escribir como:

$$\bar{\mathbf{S}} = 2 \left[\left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} + \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \mathbf{I} - \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \bar{\mathbf{C}} + \bar{I}_3 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_3} \bar{\mathbf{C}}^{-1} \right] \quad (\text{A.14})$$

Tomando en cuenta la relación de incompresibilidad ($\lambda_1^2 \lambda_2^2 \lambda_3^2 = 1$), la ecuación anterior queda expresada únicamente en términos de los invariantes 1 y 2 de la siguiente forma.

$$\bar{\mathbf{S}} = 2 \left[\left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} + \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \mathbf{I} - \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \bar{\mathbf{C}} \right] \quad (\text{A.15})$$

De esta forma sustituyendo la ecuación A.15 en la ecuación A.5, la parte desviadora del segundo tensor de esfuerzos de Piola-Kirchoff queda expresado como:

$$\mathbf{S}_{dev} = J^{-2/3} \left\{ \bar{\mathbf{S}} - \frac{2}{3} \left[\left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \mathbf{I} + \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \mathbf{I} - \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \bar{\mathbf{C}} \right) : \bar{\mathbf{C}} \right] \bar{\mathbf{C}}^{-1} \right\} \quad (\text{A.16})$$

Realizando la doble contracción con $\bar{\mathbf{C}}$ y sustituyendo los valores de $\bar{\mathbf{S}}$, \bar{I}_1 e \bar{I}_2 , la parte desviadora del segundo tensor de esfuerzos de Piola-Kirchoff queda simplificada como:

$$\begin{aligned} \mathbf{S}_{dev} = 2J^{-2/3} & \left[\left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \mathbf{I} + \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \mathbf{I} - \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \bar{\mathbf{C}} \right) \right. \\ & \left. - \frac{1}{3} \left(\bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} - 2\bar{I}_2 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \bar{\mathbf{C}}^{-1} \right] \end{aligned} \quad (\text{A.17})$$

De tal manera que sustituyendo la parte volumétrica y la parte desviadora en $\mathbf{S} = \mathbf{S}_{vol} + \mathbf{S}_{dev}$, el segundo tensor de Piola-Kirchoff se expresa como

$$\begin{aligned} \mathbf{S} = J \frac{\partial \Psi_{vol}}{\partial J} \mathbf{C}^{-1} + 2J^{-2/3} \left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \mathbf{I} + \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \mathbf{I} - \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \bar{\mathbf{C}} \right) \\ - \frac{2}{3} J^{-2/3} \left(\bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} - 2\bar{I}_2 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \mathbf{C}^{-1} \end{aligned} \quad (\text{A.18})$$

Considerando una deformación mediante tracción uniaxial el tensor gradiente de deformación $\bar{\mathbf{F}}$ y el tensor derecho de Cauchy-Green $\bar{\mathbf{C}}$ quedan expresados de la siguiente manera

$$\bar{\mathbf{F}} = \begin{bmatrix} \lambda & 0 & 0 \\ 0 & \lambda^{-\frac{1}{2}} & 0 \\ 0 & 0 & \lambda^{-\frac{1}{2}} \end{bmatrix}; \quad \bar{\mathbf{C}} = \begin{bmatrix} \lambda^2 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda^{-1} & 0 \\ 0 & 0 & \lambda^{-1} \end{bmatrix} \quad (\text{A.19})$$

De tal manera, que el tensor de esfuerzos de Cauchy para un material incompresible¹ se puede expresar como:

$$\sigma = \sigma = \bar{\mathbf{F}} \mathbf{S} \bar{\mathbf{F}}^T = \bar{\mathbf{F}} (\mathbf{S}_{vol} + \mathbf{S}_{dev}) \bar{\mathbf{F}}^T$$

Sabiendo que, $\bar{\mathbf{F}} \bar{\mathbf{F}}^T = \bar{\mathbf{B}}$ que se define como el tensor izquierdo de Cauchy-Green y recordando que el jacobiano (J) es el determinante del tensor gradiente de deformación (\mathbf{F}) (i.e $J = \det(\mathbf{F}) = 1$ para tracción uniaxial), la ecuación anterior queda expresada como:

¹Un material incompresible es aquél que presenta un volumen constante bajo cualquier deformación aplicada.

$$\begin{aligned} \sigma = \frac{\partial \Psi_{vol}}{\partial J} \mathbf{I} + 2 \left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \bar{\mathbf{B}} + \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \bar{\mathbf{B}} - \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \bar{\mathbf{B}}^2 \right) \\ - \frac{2}{3} \left(\bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} - 2 \bar{I}_2 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \mathbf{I} \end{aligned} \quad (\text{A.20})$$

Sustituyendo el tensor de gradiente de deformación y Cauchy-Green por la izquierda, y sabiendo que $\frac{\partial \Psi_{vol}}{\partial J}$ es la presión hidrostática p , el tensor de esfuerzos de Cauchy (σ) queda expresado como:

$$\begin{aligned} \sigma = -p \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} + 2 \left\{ \left(\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} + \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \begin{bmatrix} \lambda^2 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda^{-1} & 0 \\ 0 & 0 & \lambda^{-1} \end{bmatrix} \right. \\ - \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \begin{bmatrix} \lambda^4 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda^{-2} & 0 \\ 0 & 0 & \lambda^{-2} \end{bmatrix} - \frac{1}{3} \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \\ \left. + \frac{2}{3} \bar{I}_2 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \right\} \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

Para el caso de tracción uniaxial el esfuerzo en las dirección principales (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) quedan expresados como:

$$\sigma_{11} = p = 2 \left[\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \lambda^2 + 2 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \lambda - \frac{1}{3} \left(\bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} + 2 \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \right] \quad (\text{A.22})$$

$$\begin{aligned} \sigma_{22} = \sigma_{33} = -p + 2 \left[\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \left(\frac{1}{\lambda} \right) + \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \right. \\ \left. - \frac{1}{3} \left(\bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} + 2 \bar{I}_1 \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \right) \right] \end{aligned} \quad (\text{A.23})$$

Para tracción uniaxial se asume que $\sigma_{22} = \sigma_{33} = 0$, por lo tanto despejando p de la ecuación A.23 y sustituyéndola en la ecuación A.22, el componente σ_{11} queda expresado como:

$$\sigma_{11} = 2 \left[\frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_1} \left(\lambda^2 - \frac{1}{\lambda} \right) + \frac{\partial \bar{\Psi}}{\partial \bar{I}_2} \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \right] \quad (\text{A.24})$$

Hasta este punto se ha considerado que la energía de deformación es función de I_1 e I_2 , lo cual funciona muy bien para materiales totalmente isotrópicos. Sin embargo, en los materiales desarrollados en esta tesis se tiene un acomodo de las cadenas poliméricas principalmente de las cadenas de PVA. Por tal motivo, para tener un mejor ajuste de los datos experimentales nos basamos en los trabajos de Mooney [105] y de Rivlin [104], donde la función de energía de deformación se expresa como una expansión polinomial del I_1 e I_2 de la siguiente forma.

$$\Psi = \sum_{i,j=0}^{m,n} C_{ij} (I_1 - 3)^i (I_2 - 3)^j \quad (\text{A.25})$$

Donde $(I_1 - 3)$ e $(I_2 - 3)$ garantizan que la energía de deformación es nula cuando no hay deformación, C_{ij} son constantes del ajuste polinomial,

las cuales no tienen una representación física y $C_{00} = 0$. De esta forma, para el caso de las redes polimericas semi-interpenetradas se utilizó una expansión hasta tres parámetros teniendo la energía de deformación expresada como:

$$\Psi = C_{10}(I_1 - 3) + C_{01}(I_2 - 3) + C_{11}(I_1 - 3)(I_2 - 3)$$

Sustituyendo los valores de I_1 e I_2 , se tiene que:

$$\begin{aligned} \Psi = C_{10} \left(\lambda^2 + \frac{2}{\lambda} - 3 \right) + C_{01} \left(\frac{1}{\lambda^2} + 2\lambda^2 - 3 \right) \\ + C_{11} \left(\lambda^2 + \frac{2}{\lambda} - 3 \right) \left(\frac{1}{\lambda^2} + 2\lambda^2 - 3 \right) \end{aligned} \quad (\text{A.26})$$

Para un estado de esfuerzos bajo tracción uniaxial $\sigma = \frac{\partial \Psi}{\partial \lambda}$ de tal manera que el esfuerzo queda expresado como:

$$\begin{aligned} \sigma = C_{10} \left(2\lambda - \frac{2}{\lambda^2} \right) + \frac{1}{2} C_{01} \left(\frac{4}{\lambda^3} - 4\lambda^3 + 2 \left(-\frac{2}{\lambda^2} + 2\lambda \right) \left(\frac{2}{\lambda} + \lambda^2 \right) \right) \\ + \frac{1}{2} C_{11} \left(\lambda^2 + \frac{2}{\lambda} - 3 \right) \left(\frac{4}{\lambda^3} - 4\lambda^3 + 2 \left(-\frac{2}{\lambda^2} + 2\lambda \right) \left(\frac{2}{\lambda} + \lambda^2 \right) \right) \\ + C_{11} \left(-\frac{2}{\lambda^2} + 2\lambda \right) \left\{ -3 + \frac{1}{2} \left[-\frac{2}{\lambda^2} - \lambda^4 + \left(\frac{2}{\lambda} + \lambda^2 \right)^2 \right] \right\} \end{aligned}$$

Haciendo álgebra y simplificando cada uno de los términos de la ecuación, el esfuerzo para tracción uniaxial queda expresado como:

$$\begin{aligned}\sigma = & 2C_{10} \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) + 2C_{01} \left(1 - \frac{1}{\lambda^3} \right) \\ & + 6C_{11} \left(\lambda^2 - \lambda - 1 + \frac{1}{\lambda^2} + \frac{1}{\lambda^3} - \frac{1}{\lambda^4} \right)\end{aligned}\quad (\text{A.27})$$

Así pues, la ecuación A.27 se utilizó para realizar el ajuste de los datos experimentales obtenidos del ensayo de tracción uniaxial reportados en la subsección 3.5.1

Bibliografía

- [1] Ruiz Nieto Luis Gabriel. Fabricación de esponjas poliméricas a base de pdms/cs/pva/gen para la captura de contaminantes en el agua, 2022.
- [2] I.M. Garnica-Palafox and F.M. Sánchez-Arévalo. Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 151:1073 – 1081, 2016. ISSN 0144-8617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.036>.
- [3] Murugesh Shivashankar and Badal Kumar Mandal. A review on interpenetrating polymer network. *Int. J. Phram. Phram. Sci*, 4(5):1–7, 2012.
- [4] Ecaterina Stela Dragan. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. a review. *Chemical Engineering Journal*, 243:572–590, 2014. ISSN 1385-8947. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.065>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894714000904>.
- [5] Moslem Ahmadian and Mehdi Jaymand. Interpenetrating polymer network hydrogels for removal of synthetic dyes: A comprehensive review. *Coordination Chemistry Reviews*, 486:215152, 2023. ISSN 0010-8545. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215152>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854523001418>.
- [6] Jason A. Stammen, Stephen Williams, David N. Ku, and Robert E. Guldberg. Mechanical properties of a novel pva hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials*, 22(8):799 – 806, 2001. ISSN 0142-9612. doi: <https://doi.org/>

- 10.1016/S0142-9612(00)00242-8. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961200002428>.
- [7] Marina Morales-Hurtado, Xiangqiong Zeng, P Gonzalez-Rodriguez, Johan E Ten Elshof, and Emile van der Heide. A new water absorbable mechanical epidermal skin equivalent: The combination of hydrophobic pdms and hydrophilic pva hydrogel. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 46:305–317, 2015.
- [8] Jingmin Chen, Hongmei Yang, Jiusheng Li, Jinyang Chen, Yadong Zhang, and Xiangqiong Zeng. The development of an artificial skin model and its frictional interaction with wound dressings. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 94:308 – 316, 2019. ISSN 1751-6161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.03.013>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616118316758>.
- [9] Leslie P Gartner and James L Hiatt. *Color textbook of histology e-book*. Elsevier Health Sciences, 2006.
- [10] A. D. Jenkins, P. Kratochvíl, R. F. T. Stepto, and U. W. Suter. Glossary of basic terms in polymer science (iupac recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68(12):2287–2311, 1996. doi: [doi:10.1351/pac199668122287](https://doi.org/10.1351/pac199668122287). URL <https://doi.org/10.1351/pac199668122287>.
- [11] Pietro Matricardi, Chiara Di Meo, Tommasina Coviello, Wim E. Hennink, and Franco Alhaique. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9):1172–1187, 2013. ISSN 0169-409X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.002>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X13000628>. Polysaccharide-based systems in drug and gene delivery.
- [12] Chandan K. Sen, Gayle M. Gordillo, Sashwati Roy, Robert Kirsner, Lynn Lambert, Thomas K. Hunt, Finn Gottrup, Geoffrey C. Gurtner, and Michael T. Longaker. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health

and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 17(6):763–771, 2009. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>.

- [13] John P. Abraham, Brian D. Plourde, Lauren J. Vallez, Brittany B. Nelson-Cheeseman, John R. Stark, Ephraim M. Sparrow, and John M. Gorman. *Skin Burns*, chapter 33, pages 723–739. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. ISBN 9781119127420. doi: <https://doi.org/10.1002/9781119127420.ch33>. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119127420.ch33>.
- [14] Organización Mundial de la Salud. Quemaduras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns>, 2020. (Acceso el 23/05/2023).
- [15] Marc G Jeschke, Margriet E van Baar, Mashkoor A Choudhry, Kevin K Chung, Nicole S Gibran, and Sarvesh Logsetty. Burn injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1):11, 2020.
- [16] American Burn Association. Guidelines for burn patient referral. <https://ameriburn.org/resources/burnreferral>, 2023. (Acceso el 23/05/2023).
- [17] S.N. Forjuoh. Burns in low- and middle-income countries: A review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention. *Burns*, 32(5):529–537, 2006. ISSN 0305-4179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.04.002>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417906001203>.
- [18] Secretaría de Salud. 170 cuenta México con centro de alta especialidad para atender quemaduras graves. Url <https://www.gob.mx/salud/prensa/170-cuenta-mexico-con-centro-de-alta-especialidad-para-atender-quemaduras-graves>, Abril 2021. (Acceso el 04/17/2023).
- [19] International Diabetes Federation. The diabetic foot. <https://www.idf.org/our-activities/care-prevention/diabetic-foot.html>, January 2020. (Acceso el 23/05/2023).

- [20] Dereck L Hunt. Diabetes: foot ulcers and amputations. *BMJ clinical evidence*, 2011, 2011.
- [21] Komal Vig, Atul Chaudhari, Shweta Tripathi, Saurabh Dixit, Rajnish Sahu, Shree Kumar Pillai, Vida A. Dennis, and Shree R. Singh. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 2017. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms18040789. URL <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/789>.
- [22] George Han and Roger Ceilley. Chronic wound healing: A review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34(3):599–610, Mar 2017. ISSN 1865-8652. doi: 10.1007/s12325-017-0478-y. URL <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.
- [23] Dorothy M. Supp and Steven T. Boyce. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clinics in Dermatology*, 23(4):403 – 412, 2005. ISSN 0738-081X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinidematol.2004.07.023>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X04001403>.
- [24] Claudia Marcela Arenas Gómez, Gabriel Jaime Merizalde Soto, and Luz Marina Restrepo Muñera. Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos. *Iatreia*, 25:5 – 11, 01 2012. ISSN 0121-0793. URL http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932012000100005&nrm=iso.
- [25] Rajiv Nathoo, Nicole Howe, and George Cohen. Skin substitutes: an overview of the key players in wound management. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 7(10):44, 2014.
- [26] J.A. Juárez-Moreno, A. Ávila Ortega, A.I. Oliva, F. Avilés, and J.V. Cauich-Rodríguez. Effect of wettability and surface roughness on the adhesion properties of collagen on pdms films treated by capacitively coupled oxygen plasma. *Applied Surface Science*, 349:763 – 773, 2015. ISSN 0169-4332. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.063>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433215011824>.

- [27] Heidi Debels, Moustapha Hamdi, Keren Abberton, and Wayne Morrison. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options. *Plastic and reconstructive surgery Global open*, 3(1), 2015.
- [28] Mathew N Nicholas, Marc G Jeschke, and Saeid Amini-Nik. Methodologies in creating skin substitutes. *Cellular and molecular life sciences*, 73(18):3453–3472, 2016.
- [29] Shima Tavakoli and Agnes S. Klar. Bioengineered skin substitutes: Advances and future trends. *Applied Sciences*, 11(4), 2021. ISSN 2076-3417. doi: 10.3390/app11041493.
- [30] Nilgün Aksoy, Senay Arli, and Ozlem Yigit. A retrospective analysis of the burn injury patients records in the emergency department, an epidemiologic study. *Emergency*, 2(3):115, 2014.
- [31] PG Agache, C Monneur, JL Leveque, and J De Rigal. Mechanical properties and young’s modulus of human skin in vivo. *Archives of dermatological research*, 269(3): 221–232, 1980.
- [32] Catherine Escoffier, Jean de Rigal, Annie Rochefort, Régis Vasselet, Jean-Luc Léve[^]que, and Pierre G. Agache. Age-related mechanical properties of human skin: An in vivo study. *Journal of Investigative Dermatology*, 93(3):353–357, 1989. ISSN 0022-202X. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-202X\(89\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0022-202X(89)90058-4). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022202X89900584>.
- [33] A Delalleau, G Josse, JM Lagarde, H Zahouani, and JM Bergheau. Characterization of the mechanical properties of skin by inverse analysis combined with an extensometry test. *Wear*, 264(5):405–410, 2008.
- [34] Mathew Varkey, Jie Ding, and Edward E. Tredget. Advances in skin substitutes-potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *Journal of Functional Biomaterials*, 6(3):547–563, 2015. ISSN 2079-4983. doi: 10.3390/jfb6030547. URL <https://www.mdpi.com/2079-4983/6/3/547>.

- [35] Christina Dai, Shawn Shih, and Amor Khachemoune. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *Journal of Dermatological Treatment*, 0(0):1–10, 2020. doi: 10.1080/09546634.2018.1530443. URL <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>. PMID: 30265595.
- [36] Jaimie T Shores, Allen Gabriel, and Subhas Gupta. Skin substitutes and alternatives: a review. *Advances in skin & wound care*, 20(9):493–508, 2007.
- [37] Dorothea Stiefel, Clemens Schiestl, and Martin Meuli. Integra artificial skin® for burn scar revision in adolescents and children. *Burns*, 36(1):114–120, 2010. ISSN 0305-4179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.02.023>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417909000837>.
- [38] Daniel John Hubik, Jason Wasiaak, Eldho Paul, and Heather Cleland. Biobrane: A retrospective analysis of outcomes at a specialist adult burns centre. *Burns*, 37(4):594–600, 2011. ISSN 0305-4179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.01.006>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030541791100009X>.
- [39] Varun Harish, Zhe Li, and Peter K.M. Maitz. The optimal timing of outpatient biobrane™ application for superficial and mid dermal partial thickness burns: Evidence for the ‘12-hour rule’. *Burns*, 45(4):936–941, 2019. ISSN 0305-4179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.11.013>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417918305837>.
- [40] AD Rogers, S Adams, and H Rode. The introduction of a protocol for the use of biobrane for facial burns in children. *Plastic Surgery International*, 2011, 2011.
- [41] E. Garfein. 2 - skin replacement products and markets. In Dennis Orgill and Carlos Blanco, editors, *Biomaterials for Treating Skin Loss*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, pages 9–17. Woodhead Publishing, 2009. ISBN 978-1-84569-363-3. doi: <https://doi.org/10.1533/9781845695545.1.9>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978184569363350002X>.

- [42] Mohammadali Sheikholeslam, Meghan E. E. Wright, Marc G. Jeschke, and Saeid Amini-Nik. Biomaterials for skin substitutes. *Advanced Healthcare Materials*, 7(5): 1700897, 2018. doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.201700897>.
- [43] John F Burke, Ioannis V Yannas, William C Quinby Jr, Conrado C Bondoc, and Walter K Jung. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of surgery*, 194(4):413, 1981.
- [44] Bello Ysabel M., Falabella Anna F., and Eaglstein William H. Tissue-engineered skin: Current status in wound healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2(5):305 – 313, 2001. ISSN 1175-0561. URL <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsovi&AN=edsovi.00128071.200102050.00005&lang=es&site=eds-live>.
- [45] Cécile Philandrianos, Lucile Andrac-Meyer, Serge Mordon, Jean-Marc Feuerstein, Florence Sabatier, Julie Veran, Guy Magalon, and Dominique Casanova. Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. *Burns*, 38(6):820 – 829, 2012. ISSN 0305-4179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.02.008>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417912000502>.
- [46] Krishna S. Vyas and Henry C. Vasconez. Wound healing: Biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds. *Healthcare*, 2(3):356–400, 2014. ISSN 2227-9032. doi: 10.3390/healthcare2030356. URL <https://www.mdpi.com/2227-9032/2/3/356>.
- [47] Laith Alrubaiy and Kathem K Al-Rubaiy. Skin substitutes: a brief review of types and clinical applications. *Oman medical journal*, 24(1):4, 2009.
- [48] Peter Shakespeare and Valerie Shakespeare. Survey: use of skin substitute materials in uk burn treatment centres. *Burns*, 28(4):295 – 297, 2002. ISSN 0305-4179. doi: [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00062-1](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00062-1). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417902000621>.

- [49] Markéta Límová. Active wound coverings: bioengineered skin and dermal substitutes. *The Surgical Clinics of North America*, 90(6):1237–1255, December 2010. ISSN 0039-6109. doi: 10.1016/j.suc.2010.08.004. URL <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.08.004>.
- [50] John Noordenbos, Christine Doré, and John F. Hansbrough. Safety and efficacy of transcyte for the treatment of partial-thickness burns. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 20(4):275–281, 07 1999. ISSN 0273-8481. doi: 10.1097/00004630-199907000-00002. URL <https://doi.org/10.1097/00004630-199907000-00002>.
- [51] Davide Campoccia, Patrick Doherty, Marco Radice, Paola Brun, Giovanni Abatan-gelo, and David F. Williams. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 19(23):2101 – 2127, 1998. ISSN 0142-9612. doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00042-8). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961298000428>.
- [52] Simon R. Myers, Vaiude N. Partha, Carlo Soranzo, Richard D. Price, and Harshad A. Navsaria. Hyalomatrix: A temporary epidermal barrier, hyaluronan delivery, and neodermis induction system for keratinocyte stem cell therapy. *Tissue Engineering*, 13(11):2733–2741, 2007. doi: 10.1089/ten.2007.0109. URL <https://doi.org/10.1089/ten.2007.0109>. PMID: 17880270.
- [53] Giovanni Nicoletti, Marco Mario Tresoldi, Alberto Malovini, Marco Visaggio, Angela Faga, and Silvia Scevola. Versatile use of dermal substitutes: a retrospective survey of 127 consecutive cases. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 51(1):46, 2018.
- [54] Jian-Ming Lü, Xinwen Wang, Christian Marin-Muller, Hao Wang, Peter H Lin, Qizhi Yao, and Changyi Chen. Current advances in research and clinical applications of plga-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9(4):325–341, 2009. doi: 10.1586/erm.09.15. URL <https://doi.org/10.1586/erm.09.15>. PMID: 19435455.

- [55] Nadia Vázquez, Francisco Sánchez-Arévalo, Alfredo Maciel-Cerda, Itzel Garnica-Palafox, Rodrigo Ontiveros-Tlachi, Casandra Chaires-Rosas, Gabriela Piñón-Zarate, Miguel Herrera-Enríquez, Mathieu Hautefeuille, Ricardo Vera-Graziano, and Andrés Castell-Rodríguez. Influence of the PLGA/gelatin ratio on the physical, chemical and biological properties of electrospun scaffolds for wound dressings. *Biomedical Materials*, 14(4):045006, may 2019. doi: 10.1088/1748-605x/ab1741. URL <https://doi.org/10.1088%2F1748-605x%2Fab1741>.
- [56] Rohit Uppal, Gita N. Ramaswamy, C. Arnold, Robert Goodband, and Y. Wang. Hyaluronic acid nanofiber wound dressing—production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97B(1):20–29, 2011. doi: 10.1002/jbm.b.31776. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.b.31776>.
- [57] Elbadawy A. Kamoun, El-Refaie S. Kenawy, and Xin Chen. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: Pva-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 8(3):217 – 233, 2017. ISSN 2090-1232. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123217300243>.
- [58] Tianhong Dai, Masamitsu Tanaka, Ying-Ying Huang, and Michael R Hamblin. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(7):857–879, 2011.
- [59] Román A. Pérez, Jong-Eun Won, Jonathan C. Knowles, and Hae-Won Kim. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(4):471 – 496, 2013. ISSN 0169-409X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.009>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12001056>. Bionics - Biologically inspired smart materials.
- [60] Hamid Hamed, Sara Moradi, Samuel M. Hudson, and Alan E. Tonelli. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 199:445 – 460, 2018. ISSN 0144-8617. doi:

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.114>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718307690>.
- [61] Isadora C. Carvalho and Herman S. Mansur. Engineered 3d-scaffolds of photocross-linked chitosan-gelatin hydrogel hybrids for chronic wound dressings and regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 78:690–705, 2017. ISSN 0928-4931. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.126>.
- [62] Florence Croisier and Christine Jérôme. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4):780–792, 2013. ISSN 0014-3057. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>. Biobased Polymers and Related Materials.
- [63] Narayan Bhattarai, Jonathan Gunn, and Miqin Zhang. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1):83 – 99, 2010. ISSN 0169-409X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09002828>. Chitosan-Based Formulations of Drugs, Imaging Agents and Biotherapeutics.
- [64] Hamid Hamed, Sara Moradi, Samuel M. Hudson, and Alan E. Tonelli. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 199:445 – 460, 2018. ISSN 0144-8617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.114>.
- [65] Severian Dumitriu and Valentin I Popa. *Polymeric biomaterials*, volume 2. CRC Press, 2013.
- [66] H.M.P. Naveen Kumar, M.N. Prabhakar, C. Venkata Prasad, K. Madhusudhan Rao, T.V. Ashok Kumar Reddy, K. Chowdoji Rao, and M.C.S. Subha. Compatibility studies of chitosan/pva blend in 2solution at 30 °c. *Carbohydrate Polymers*, 82(2):251 – 255, 2010. ISSN 0144-8617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.021>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861710002869>.

- [67] Tapan Kumar Giri, Amrita Thakur, Amit Alexander, Ajazuddin, Hemant Badwaik, and Dulal Krishna Tripathi. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5):439 – 449, 2012. ISSN 2211-3835. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.07.004>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383512001153>.
- [68] Maria Onaira Gonçalves Ferreira, Layara Lorrana Ribeiro Leite, Idglan Sá de Lima, Humberto Medeiros Barreto, Lívio César Cunha Nunes, Alessandra Braga Ribeiro, Josy Antevelli Osajima, and Edson Cavalcanti da Silva Filho. Chitosan hydrogel in combination with nerolidol for healing wounds. *Carbohydrate Polymers*, 152:409 – 418, 2016. ISSN 0144-8617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.037>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716308268>.
- [69] R Jayakumar, M Prabakaran, PT Sudheesh Kumar, SV Nair, and H Tamura. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology advances*, 29(3):322–337, 2011.
- [70] Lingxiao Liu, Haiyan Liang, Jing Zhang, Pengfei Zhang, Quan Xu, Qiming Lu, and Chaoqun Zhang. Poly (vinyl alcohol)/chitosan composites: Physically transient materials for sustainable and transient bioelectronics. *Journal of Cleaner Production*, 195:786–795, 2018.
- [71] Arash Moeini, Parisa Pedram, Pooyan Makvandi, Mario Malinconico, and Giovanna Gomez d’Ayala. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 233: 115839, 2020. ISSN 0144-8617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>.
- [72] Ming-Chia Yang, Shoei-Shen Wang, Nai-Kuan Chou, Nai-Hsin Chi, Yi-You Huang, Yu-Lin Chang, Ming-Jium Shieh, and Tze-Wen Chung. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin–polysaccharide cardiac patches in vitro. *Biomaterials*, 30(22):3757–3765, 2009. ISSN 0142-9612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.057>.

- [73] IM Garnica-Palafox, M Álvarez-Camacho, and FM Sánchez-Arévalo. Macro-and micromechanical responses of an elastomeric membrane undergoing biaxial tension by indentation. *Journal of Materials Science*, 54(22):14255–14274, 2019.
- [74] Maribel I. Baker, Steven P. Walsh, Zvi Schwartz, and Barbara D. Boyan. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B(5):1451–1457, 2012. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694>.
- [75] Mamatha M Pillai, V Elakkiya, H Lakshmi priya, J Gopinathan, R Selvakumar, and Amitava Bhattacharyya. A novel method for developing three dimensional (3d) silk–pva microenvironments for bone tissue engineering—an in vitro study. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 4(2):027006, 2018.
- [76] Nikolaos A. Peppas and Edward W. Merrill. Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 11(3):423–434, 1977. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.820110309>.
- [77] Ana Mayela Ramos-de-la Peña, Catherine MGC Renard, Julio Montañez, María de la Luz Reyes-Vega, and Juan Carlos Contreras-Esquivel. A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochemistry Reviews*, 15:37–49, 2016.
- [78] Hsiang-Jung Tseng, Tai-Li Tsou, Hsian-Jenn Wang, and Shan-hui Hsu. Characterization of chitosan–gelatin scaffolds for dermal tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(1):20–31, 2013. doi: 10.1002/term.492. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.492>.
- [79] Michael F. Butler, Yiu-Fai Ng, and Paul D. A. Pudney. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41(24):3941–3953, 2003. doi: <https://doi.org/10.1002/pola.10960>.

- [80] Muthu K Shanmugam, Hongyuan Shen, Feng Ru Tang, Frank Arfuso, Mohanraj Rajesh, Lingzhi Wang, Alan Prem Kumar, Jinsong Bian, Boon Cher Goh, Anupam Bishayee, et al. Potential role of genipin in cancer therapy. *Pharmacological research*, 133:195–200, 2018.
- [81] Lei Cao, Xiaofeng Wu, Qiugen Wang, and Jiandong Wang. Biocompatible nanocomposite of tio2 incorporated bi-polymer for articular cartilage tissue regeneration: A facile material. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178:440 – 446, 2018. ISSN 1011-1344. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.026>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134417311429>.
- [82] I.M. Garnica-Palafox, H.O. Estrella-Monroy, N.A. Vázquez-Torres, M. Álvarez Camacho, A.E. Castell-Rodríguez, and F.M. Sánchez-Arévalo. Influence of multi-walled carbon nanotubes on the physico-chemical and biological responses of chitosan-based hybrid hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 236:115971, 2020. ISSN 0144-8617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115971>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720301454>.
- [83] Agnieszka K Dabrowska. *From the characterization of human skin to the development of a skin model*. PhD thesis, ETH Zurich, 2017.
- [84] Yayun Fu, Hongbo Zhou, Chunping Jia, Fengxiang Jing, Qinghui Jin, Jianlong Zhao, and Gang Li. A microfluidic chip based on surfactant-doped polydimethylsiloxane (pdms) in a sandwich configuration for low-cost and robust digital pcr. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 245:414–422, 2017. ISSN 0925-4005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.161>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400517301685>.
- [85] Hon-Wing Leung. Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(1):26–39, 2001. ISSN 0147-6513. doi: <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2031>.

- [86] Fernanda Silva Tenório, Thaís Larissa do Amaral Montanheiro, Alexandre Martins Isaias dos Santos, Mateus dos Santos Silva, Ana Paula Lemes, and Dayane Batista Tada. Chitosan hydrogel covalently crosslinked by gold nanoparticle: Eliminating the use of toxic crosslinkers. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(6):49819, 2021. doi: <https://doi.org/10.1002/app.49819>.
- [87] Elsevier Connect. Colágenos: tipos, composición, características y distribución en tejidos, 2019. URL <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/colagenos-tipos-composicion-distribucion-tejidos>.
- [88] Benítez Martínez Jorge Alejandro. Síntesis y caracterización de membranas poliméricas basadas en poli(dimetilsiloxano)/poli(alcohol vinílico) entrecruzadas con genipin y glutaraldehído. Master's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Julio 2019.
- [89] R. Hopf, L. Bernardi, J. Menze, M. Zündel, E. Mazza, and A.E. Ehret. Experimental and theoretical analyses of the age-dependent large-strain behavior of sylgard 184 (10:1) silicone elastomer. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 60:425–437, 2016. ISSN 1751-6161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.02.022>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616116000758>.
- [90] Eric Leclerc, Yasuyuki Sakai, and Teruo Fujii. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of pdms (polydimethylsiloxane). *Biomedical microdevices*, 5: 109–114, 2003.
- [91] Riccardo A.A. Muzzarelli. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1):1–9, 2009. ISSN 0144-8617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861709000526>.
- [92] Garnica Palafox Itzel Marisol. *Síntesis y caracterización de hidrogeles híbridos nano-compuestos*. PhD thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Agosto 2019.

- [93] Dow Corning. Sylgard 184 silicone elastomer. *Technical Data Sheet*, 2008.
- [94] H. H. Winter. Can the gel point of a cross-linking polymer be detected by the $g' - g''$ crossover. *Polymer Engineering & Science*, 27(22):1698–1702, 1987. doi: <https://doi.org/10.1002/pen.760272209>.
- [95] E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, I.M. Elewa, and H.H. Soliman. Roughness parameters. *Journal of Materials Processing Technology*, 123(1):133 – 145, 2002. ISSN 0924-0136. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-0136\(02\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0924-0136(02)00060-2). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924013602000602>.
- [96] Hossein Omidian and Kinam Park. Introduction to hydrogels. In *Biomedical applications of hydrogels handbook*, pages 1–16. Springer, 2010.
- [97] Bernhard Hofko, Mohammad Zia Alavi, Hinrich Grothe, David Jones, and John Harvey. Repeatability and sensitivity of ftr atr spectral analysis methods for bituminous binders. *Materials and Structures*, 50:1–15, 2017.
- [98] Hua Zheng, YM Du, Jia-Hui Yu, and L Xiao. The properties and preparation of crosslinked chitosan films. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 21(5): 809–812, 2000.
- [99] Brahatheeswaran Dhandayuthapani, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa, and D Sakthi Kumar. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International journal of polymer science*, 2011, 2011.
- [100] Joshua Boateng, Kerr Matthews, Howard Stevens, and Gillian Eccleston. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97:2892 – 2923, 08 2008. doi: 10.1002/jps.21210.
- [101] Leslie Ronald George Treloar. *The physics of rubber elasticity*. Oxford University Press, USA, 1975.

- [102] Albert Edward Green and John Edward Adkins. *Large elastic deformations and non-linear continuum mechanics*. Clarendon Press, 1960.
- [103] Oon H Yeoh. Some forms of the strain energy function for rubber. *Rubber Chemistry and technology*, 66(5):754–771, 1993.
- [104] Ronald S Rivlin. Large elastic deformations of isotropic materials iv. further developments of the general theory. *Philosophical transactions of the royal society of London. Series A, Mathematical and physical sciences*, 241(835):379–397, 1948.
- [105] M. Mooney. A theory of large elastic deformation. *Journal of Applied Physics*, 11(9):582–592, 1940. doi: 10.1063/1.1712836.
- [106] Raymond William Ogden. Large deformation isotropic elasticity—on the correlation of theory and experiment for incompressible rubberlike solids. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 326(1567):565–584, 1972.
- [107] Nomesk Kumar and V Venkateswara Rao. Hyperelastic mooney-rivlin model: determination and physical interpretation of material constants. *Parameters*, 2(10):01, 2016.
- [108] Yu Dong, RJT Lin, and D Bhattacharyya. Determination of critical material parameters for numerical simulation of acrylic sheet forming. *Journal of materials science*, 40(2):399–410, 2005.
- [109] David C Lin, David I Shreiber, Emilios K Dimitriadis, and Ferenc Horkay. Spherical indentation of soft matter beyond the hertzian regime: numerical and experimental validation of hyperelastic models. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 8:345–358, 2009.
- [110] Anne E Carpenter, Thouis R Jones, Michael R Lamprecht, Colin Clarke, In Han Kang, Ola Friman, David A Guertin, Joo Han Chang, Robert A Lindquist, Jason Moffat, et al. Cellprofiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology*, 7:1–11, 2006.

- [111] Lee Kametsky, Thouis R Jones, Adam Fraser, Mark-Anthony Bray, David J Logan, Katherine L Madden, Vebjorn Ljosa, Curtis Rueden, Kevin W Eliceiri, and Anne E Carpenter. Improved structure, function and compatibility for cellprofiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics*, 27(8):1179–1180, 2011.
- [112] Claire McQuin, Allen Goodman, Vasilii Chernyshev, Lee Kametsky, Beth A Cimini, Kyle W Karhohs, Minh Doan, Liya Ding, Susanne M Rafelski, Derek Thirstrup, et al. Cellprofiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS biology*, 16(7):e2005970, 2018.
- [113] David R Stirling, Madison J Swain-Bowden, Alice M Lucas, Anne E Carpenter, Beth A Cimini, and Allen Goodman. Cellprofiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC bioinformatics*, 22:1–11, 2021.
- [114] L. H. Sperling and V. Mishra. The current status of interpenetrating polymer networks. *Polymers for Advanced Technologies*, 7(4):197–208, 1996. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1581\(199604\)7:4<197::AID-PAT514>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1581(199604)7:4<197::AID-PAT514>3.0.CO;2-4).
- [115] Rosalva S. Marques, Tatiana C. O. Mac Leod, Inez Valria Pagotto Yoshida, Valdir Mano, Marilda D. Assis, and Marco A. Schiavon. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating networks based on poly(dimethylsiloxane) and poly(vinyl alcohol). *Journal of Applied Polymer Science*, 115(1):158–166, 2010. doi: 10.1002/app.31006. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.31006>.
- [116] Elidiane Carvalho Coelho, Daniela Pereira dos Santos, Kátia Jorge Ciuffi, Jefferson Luis Ferrari, Beatriz Alves Ferreira, and Marco Antonio Schiavon. Poly(vinyl alcohol) and poly(dimethylsiloxane)-based interpenetrating polymer networks via radical polymerisation. *Journal of Polymer Research*, 21(9):561, Aug 2014. ISSN 1572-8935. doi: 10.1007/s10965-014-0561-x. URL <https://doi.org/10.1007/s10965-014-0561-x>.
- [117] Carl Djerassi, J.D. Gray, and Fred A. Kincl. Naturally occurring oxygen heterocyclics. ix.1 isolation and characterization of genipin2. *Journal of Organic Chemistry*, 25(12):2174 – 2177, 1960. doi: 10.1021/jo01082a022.

- [118] Attila Oláh, Henrik Hillborg, and G Julius Vancso. Hydrophobic recovery of uv/ozone treated poly (dimethylsiloxane): adhesion studies by contact mechanics and mechanism of surface modification. *Applied Surface Science*, 239(3-4):410–423, 2005.
- [119] Rachelle N Palchesko, Ling Zhang, Yan Sun, and Adam W Feinberg. Development of polydimethylsiloxane substrates with tunable elastic modulus to study cell mechanobiology in muscle and nerve. *PloS one*, 7(12):e51499, 2012.
- [120] Szymon Prauzner-Bechcicki, Joanna Raczkowska, Ewelina Madej, Joanna Pabijan, Jaroslav Lukes, Josef Sepitka, Jakub Rysz, Kamil Awsiuk, Andrzej Bernasik, Andrzej Budkowski, et al. Pdms substrate stiffness affects the morphology and growth profiles of cancerous prostate and melanoma cells. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 41:13–22, 2015.
- [121] Maria Grolik, Krzysztof Szczubialka, Bogumil Wowra, Dariusz Dobrowolski, Boguslawa Orzechowska-Wylkegala, Edward Wylkegala, and Maria Nowakowska. Hydrogel membranes based on genipin-cross-linked chitosan blends for corneal epithelium tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(8):1991–2000, 2012.
- [122] A. Ranella, M. Barberoglou, S. Bakogianni, C. Fotakis, and E. Stratakis. Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3d micro/nano silicon structures. *Acta Biomaterialia*, 6(7):2711–2720, 2010. ISSN 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.016>.
- [123] Sylwia Fiejdasz, Wojciech Horak, Joanna Lewandowska-Lańcucka, Michał Szuwarzyński, Józef Salwiński, and Maria Nowakowska. Tuning of elasticity and surface properties of hydrogel cell culture substrates by simple chemical approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 524:102 – 113, 2018. ISSN 0021-9797. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.004>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979718303771>.

- [124] Adam S. Crouch, D. Miller, Kevin J. Luebke, and W. Hu. Correlation of anisotropic cell behaviors with topographic aspect ratio. *Biomaterials*, 30(8):1560–1567, 2009. ISSN 0142-9612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.041>.
- [125] K. Anselme, M. Bigerelle, B. Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Iost, and P. Hardouin. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49(2):155–166, 2000.
- [126] Michael Ball, David M. Grant, Wei-Jen Lo, and Colin A. Scotchford. The effect of different surface morphology and roughness on osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86A(3):637–647, 2008. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31652>.
- [127] Siddhi Gupta, Thomas J. Webster, and Arvind Sinha. Evolution of pva gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(7):1763–1772, Jul 2011. ISSN 1573-4838. doi: 10.1007/s10856-011-4343-2. URL <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4343-2>.
- [128] Jessamine Ng Lee, Cheolmin Park, and George M. Whitesides. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 75(23):6544–6554, 2003. doi: 10.1021/ac0346712. URL <https://doi.org/10.1021/ac0346712>. PMID: 14640726.
- [129] I. M. Garnica-Palafox, H. O. Estrella-Monroy, J. A. Benítez-Martínez, M. Bizarro, and F. M. Sánchez-Arévalo. Influence of genipin and multi-walled carbon nanotubes on the dye capture response of cs/pva hybrid hydrogels. *Journal of Polymers and the Environment*, 2022. doi: 10.1007/s10924-022-02534-x.
- [130] Ezequiel S. Costa-Junior, Edel F. Barbosa-Stancioli, Alexandra A.P. Mansur, Wander L. Vasconcelos, and Herman S. Mansur. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3):472 – 481, 2009. ISSN 0144-8617. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.015>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861708005213>.

- [131] Esam A El-Hefian, Mohamed Mahmoud Nasef, and Abdul Hamid Yahaya. The preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) blended films. *European journal of chemistry*, 7, 2010.
- [132] JA Benítez-Martínez, IM Garnica-Palafox, G Vázquez-Victorio, M Hautefeuille, and FM Sánchez-Arévalo. Semi-interpenetrating polymeric networks based on poly (dimethylsiloxane)-chitosan-poly (vinyl alcohol) crosslinked with genipin with possible use in biomedical applications. *Journal of Materials Science*, 56(9):5936–5955, 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s10853-020-05683-3>.
- [133] Dhananjay Bodas and Chantal Khan-Malek. Formation of more stable hydrophilic surfaces of pdms by plasma and chemical treatments. *Microelectronic Engineering*, 83(4):1277–1279, 2006. ISSN 0167-9317. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mee.2006.01.195>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167931706001213>. Micro- and Nano-Engineering MNE 2005.
- [134] Masamichi Tsuboi. Infrared spectrum and crystal structure of cellulose. *Journal of Polymer Science*, 25(109):159–171, 1957. doi: <https://doi.org/10.1002/pol.1957.1202510904>. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pol.1957.1202510904>.
- [135] Katarzyna Lewandowska. Miscibility and thermal stability of poly (vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochimica Acta*, 493(1-2):42–48, 2009.
- [136] G Camino, S.M Lomakin, and M Lazzari. Polydimethylsiloxane thermal degradation part 1. kinetic aspects. *Polymer*, 42(6):2395–2402, 2001. ISSN 0032-3861. doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00652-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00652-2).
- [137] Reinher Pimentel-Domínguez, Amado M. Velázquez-Benítez, J. Rodrigo Vélez-Cordero, Mathieu Hautefeuille, Francisco Sánchez-Arévalo, and Juan Hernández-Cordero. Photothermal effects and applications of polydimethylsiloxane mem-

branes with carbon nanoparticles. *Polymers*, 8(4), 2016. ISSN 2073-4360. doi: 10.3390/polym8040084. URL <http://www.mdpi.com/2073-4360/8/4/84>.

- [138] Thomas J Webster Aboubakr M Abdullah Gheyath K Nasrallah Khalil Abdelrazek Khalil Adriaan S Luyt Alaa J Hassiba, Mohamed E El Zowalaty and Ahmed A Elzatahry. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of novel double layer nanocomposite electrospun fibers for wound dressing applications. *International Journal of Nanomedicine*, 12:2205–2213, 2017. doi: 10.2147/IJN.S123417. URL <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/IJN.S123417>.
- [139] Jorge Iván Castro, Manuel N. Chaur, Carlos Humberto Valencia Llano, Mayra Eliana Valencia Zapata, José Herminul Mina Hernandez, and Carlos David Grande-Tovar. Biocompatibility study of electrospun nanocomposite membranes based on chitosan/polyvinyl alcohol/oxidized carbon nano-onions. *Molecules*, 26(16), 2021. ISSN 1420-3049. doi: 10.3390/molecules26164753. URL <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/16/4753>.
- [140] Forough Ataollahi, Sumit Pramanik, Ali Moradi, Adel Dalilottojari, Belinda Pinguan-Murphy, Wan Abu Bakar Wan Abas, and Noor Azuan Abu Osman. Endothelial cell responses in terms of adhesion, proliferation, and morphology to stiffness of polydimethylsiloxane elastomer substrates. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(7):2203–2213, 2015. doi: 10.1002/jbm.a.35186. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.35186>.
- [141] P.-A Albouy. The conformation of poly(dimethylsiloxane) in the crystalline state. *Polymer*, 41(8):3083–3086, 2000. ISSN 0032-3861. doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00664-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00664-3).
- [142] Liangliang Qu, Guangsu Huang, Qiang Wang, and Zhijian Xie. Effect of diphenylsiloxane unit content on aggregation structure of poly(dimethylsiloxane-co-diphenylsiloxane). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 46(1): 72–79, 2008. doi: <https://doi.org/10.1002/polb.21343>.

- [143] Ghanshyam L. Jadav, Vinod K. Aswal, Hitesh Bhatt, Jayesh C. Chaudhari, and Puyam S. Singh. Influence of film thickness on the structure and properties of pdms membrane. *Journal of Membrane Science*, 415-416:624–634, 2012. ISSN 0376-7388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.05.043>.
- [144] F. M. Sánchez-Arévalo, I. M. Garnica-Palafox, P. Jagdale, J. Hernández-Cordero, S. E. Rodil, A. O. Okonkwo, F. C. Robles Hernandez, and A. Tagliaferro. Photo-mechanical response of composites based on pdms and carbon soot nanoparticles under ir laser irradiation. *Opt. Mater. Express*, 5(8):1792–1805, Aug 2015. doi: 10.1364/OME.5.001792.
- [145] Chengpeng Li, Mary She, Xiaodong She, Jane Dai, and Lingxue Kong. Functionalization of polyvinyl alcohol hydrogels with graphene oxide for potential dye removal. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(3), 2014. doi: 10.1002/app.39872. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.39872>.
- [146] J Vivas, D Garzón-Alvarado, and M Cerrolaza. Modeling cell adhesion and proliferation: a cellular-automata based approach. *Advanced modeling and simulation in engineering sciences*, 2(1):32, 2015.
- [147] Mozhdeh Imaninezhad, Joseph Schober, David Griggs, Peter Ruminski, Irma Kuljanishvili, and Silviya Petrova Zustiak. Cell attachment and spreading on carbon nanotubes is facilitated by integrin binding. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, page 129, 2018. ISSN 2296-4185. doi: 10.3389/fbioe.2018.00129.
- [148] E.J. Chong, T.T. Phan, I.J. Lim, Y.Z. Zhang, B.H. Bay, S. Ramakrishna, and C.T. Lim. Evaluation of electrospun pcl/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia*, 3(3):321–330, 2007. ISSN 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.01.002>. 2nd TMS Symposium on biological materials science.
- [149] Gary J. Fisher, Yuan Shao, Tianyuan He, Zhaoping Qin, Daniel Perry, John J. Voorhees, and Taihao Quan. Reduction of fibroblast size/mechanical force down-

regulates $\text{tgf-}\beta$ type ii receptor: implications for human skin aging. *Aging Cell*, 15 (1):67–76, 2016. doi: <https://doi.org/10.1111/accel.12410>.

- [150] Jung-Won Shin, Soon-Hyo Kwon, Ji-Young Choi, Jung-Im Na, Chang-Hun Huh, Hye-Ryung Choi, and Kyung-Chan Park. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2019. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms20092126.
- [151] Ghazal Shabestani Monfared, Peter Ertl, and Mario Rothbauer. An on-chip wound healing assay fabricated by xurography for evaluation of dermal fibroblast cell migration and wound closure. *Scientific reports*, 10(1):1–14, 2020.
- [152] Zhuonan Yu, Matthew J. Smith, Richard C.M. Siow, and Kuo-Kang Liu. Ageing modulates human dermal fibroblast contractility: Quantification using nano-biomechanical testing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(5):118972, 2021. ISSN 0167-4889. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118972>.
- [153] Juan Arenas. [dermatología] las heridas y su cicatrización. *Offarm: farmacia y sociedad*, 22(5):126–132, 2003.
- [154] Lei Gao, Hui Gan, Zhiyun Meng, Ruolan Gu, Zhuona Wu, Ling Zhang, Xiaoxia Zhu, Wenzhong Sun, Jian Li, Ying Zheng, and Guifang Dou. Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117:398–405, 2014. ISSN 0927-7765. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.002>.
- [155] PJ Flory et al. Principles of polymer chemistry ithaca. NY: Cornell University, 1953.